Health and Welfare Canada
Santé et Bien-être social Canada

Carcinogen Assessment

Canada

Carcinogen Assessment

A Research Report to the Department of
National Health and Welfare

©Minister of Supply and Services Canada, 1991
Cat H49-69/1991
ISBN 0-662-58750-2

Committee on Carcinogenesis

Dr. E. Somers (Chairperson)
Director General
Drugs Directorate
Room 107, Health Protection Bldg.
Tunney's Pasture

Dr. D.B. Clayson
Toxicology Research Division
Bureau of Chemical Safety
Food Directorate
2nd Floor, Banting Bldg.
Tunney's Pasture

Ms. Pat Curry
Pesticides Division
Environmental Health Directorate
Brooke Claxton Bldg.
Tunney's Pasture

Dr. C. Franklin
Chief, Environmental and
Occupational Toxicology Division
Bureau of Chemical Hazards
Environmental Health Directorate
Room 118,
Environmental Health Centre
Tunney's Pasture

Dr. D.L. Grant
Chief, Toxicological Evaluation
Division
Bureau of Chemical Safety
Food Directorate
Room 2-2, Health Protection Bldg.
Tunney's Pasture

Dr. D. Krewski
Chief, Biostatistics and
Computer Applications Division
Environmental Health Directorate
Room 117,
Environmental Health Centre
Tunney's Pasture

Dr. T. Matula
Head, Genetic Toxicology Section
Drug Toxicology Division
Bureau of Drug Research
Drugs Directorate
2-West, Banting Bldg.
Tunney's Pasture

Dr. L. Ritter
Chief, Pesticides Division
Bureau of Chemical Hazards
Environmental Health Directorate
Room B-43,
Environmental Health Centre
Tunney's Pasture

Dr. D. Wigle
Chief, Disease Surveillance and Risk
Assessment
Bureau of Chronic Disease
Epidemiology
Laboratory Centre for Disease Control
Room 37A, LCDC Bldg.
Tunney's Pasture

92-04783/

Table of Contents

		Page
	Executive Summary	**9**
1.	**Introduction**	**13**
	1.1 Legislation and Control of Health Hazards	**13**
	1.2 Cancer: The Nature of the Problem	13
	1.2.1 Mortality and Morbidity in Canada	13
	1.2.2 What is Cancer?	14
	1.2.3 Cancer Causation	15
	1.2.3.1 Viruses	15
	1.2.3.2 Radiation and Radioisotopes	15
	1.2.3.3 Physical Agents	16
	1.2.3.4 Chemicals	16
	1.3 Definitions	17
2.	**Epidemiology**	**18**
	2.1 Role of Epidemiology	18
	2.2 Principles of Epidemiology	18
	2.3 Case Reports	19
	2.4 Descriptive Epidemiology	19
	2.4.1 Bladder Cancer Among Aluminum Refining Workers	19
	2.5 Ecologic Studies	20
	2.5.1 Breast Cancer and Fertility Trends	20
	2.5.2 Variation by Income Level in the Risk of Death Due to Cancer	20
	2.6 Case-Control Studies	21
	2.7 Cohort Studies	21
	2.7.1 Radiation-induced Lung Cancer in Newfoundland Fluorspar Miners	22
	2.8 Intervention Studies	22
	2.9 Interpretation of Epidemiological Studies	23
3.	**Selection of Chemicals for Carcinogenesis Bioassay**	**24**
	3.1 Assessment of Previous Data	25
	3.2 Utility of Genotoxicity Data	25
	3.3 Tests for Non-genotoxic Carcinogens	25
	3.4 Structure-Activity Relationships	26
	3.5 Conclusions	27

		Page
4.	**Conduct of the Cancer Bioassay**	**28**
4.1	Good Laboratory Practices	28
4.2	Design of the Bioassay	29
4.2.1	The Test Chemical	29
4.2.2	Choice of Animal Species and Strain	29
4.2.3	Routes of Administration of the Test Chemical	30
4.2.4	Dose Selection	30
4.2.5	Numbers of Animals to be Used	31
4.2.6	Diet	31
4.2.7	Avoidance of Bias	32
4.2.8	Study Duration	32
4.2.9	Special Protocols	33
4.2.9.1	Extended Protocols	33
4.2.9.2	Mechanistic Protocols	33
4.2.9.3	Rapid Protocols	34
4.3	Practical Considerations	34
5.	**Determination of Human Exposures**	**35**
5.1	Role of Exposure Assessment	35
5.2	Principles of Exposure Assessment	36
5.3	Methodology of Exposure Assessment	36
5.3.1	Monitoring Studies	37
5.3.1.1	Ambient Monitoring	37
5.3.1.1.1	Environmental Monitoring	37
5.3.1.1.2	Personal Monitoring	38
5.3.1.2	Biological Monitoring	43
5.3.1.2.1	Determination of a Chemical or its Metabolites in Biological Fluids	43
5.3.1.2.2	Measuring Non-adverse Biological Effects	44
5.3.2	Modelling Studies	44
5.4	Some Important Issues Affecting Interpretation of Exposure Estimates	45
5.4.1	Time-dependent Exposures	45
5.4.2	Extrapolation to Large Populations	46
5.4.3	High-risk Populations	46
5.4.4	Quality Assurance	47
5.4.5	Summary – Overall Limitations of Exposure Estimation	47

Page

6.0 Interpretation and Evaluation of Carcinogenesis Data . . 49

6.1 The Classical Approach to the Assessment of Hazard to Humans from Animal Carcinogens 50
6.1.1 General Considerations 50
6.1.2 Considerations of Dose, Pharmacokinetics, and Metabolism of DNA-interactive Carcinogens and the Shape of the Dose-Response Curve 50
6.1.3 Quantitative Factors in Carcinogenesis Risk Assessment 52
6.1.3.1 Mathematical Models of Carcinogenesis 52
6.1.3.2 Carcinogenic Potency 53
6.1.3.3 Low-dose Risk Assessment 54
6.1.3.4 Pharmacokinetics 55
6.1.3.5 Species Conversion 56
6.2 Carcinogenesis Mechanisms 56
6.2.1 The Mechanism of Genotoxic Carcinogenicity 56
6.2.2 Mechanistic Aspects of Cancer Promotion or Development 58
6.2.3 Genotoxic and Non-genotoxic Carcinogens 59
6.3 Weight of the Evidence Approach 61
6.3.1 Background Tumours 62
6.3.2 High-dose Toxicity 65
6.3.2.1 Butylated Hydroxyanisole 65
6.4 Conclusions 66

7. Regulation of Carcinogens 68

8.0 *Quo Vadis*: The Future of the Carcinogenesis Animal Bioassay 70

9.0 References 72

List of Tables

Table 1-1 Legislation permitting the Health Protection Branch to regulate hazardous substances in food, drugs, and the environment 14
Table 6-1 The U.S. Environmental Protection Agency's classification of carcinogens 62

Executive Summary

In 1990, an estimated 29 900 men and 24 600 women died from cancer in Canada. Cancers are now recognized to be due to one or more of at least four different classes of agents: viruses, radiation, certain physical agents, and specific chemicals. Those agents that significantly increase the rate of formation of malignant tumours in a population are known as carcinogens.

The International Agency for Research on Cancer has concluded that sufficient evidence of carcinogenicity in humans can be provided only by human studies. Epidemiological evidence of carcinogenicity in humans comes from three main sources:

1. Case reports of clusters of individual cancer patients who have been exposed to the carcinogen.

2. Descriptive epidemiological studies, in which the incidence of cancer in human populations is found to vary by place or time in relation to exposure to the agent (e.g., the relationship between bladder cancer and employment at an aluminum refining plant in Chicoutimi).

3. Analytical epidemiological studies, in which individuals' exposures to the agent are found to be associated with an increased risk of cancer. These include:

a. ecologic or correlative epidemiological studies, which analyze the relationship between exposure status for one or more factors and the risk of a disease within groups (e.g., the relationship between early pregnancy and risk of breast cancer);

b. case-control studies, in which information on exposure to potential causal factors is obtained after the fact from cases and from unaffected individuals (e.g., the relationship between vaginal cancers and women whose mothers were given diethylstilbestrol);

c. cohort studies, in which information concerning the level of various exposures in the study population is obtained at the outset and the population is monitored over a period of time (e.g., the relationship between lung cancer and radiation exposure in Newfoundland fluorspar miners); and

d. intervention studies, which involve the random allocation of persons to treatment and control categories to compare the effect of an intervention (e.g., dietary fat reduction *vs* no intervention) on health status (e.g., risk of breast cancer).

Over 40 000 chemicals are used in commercially significant quantities, and about 1000 new or replacement chemicals are introduced each year. Only 6000 of these chemicals have so far been tested for toxicity, although not all have been extensively evaluated. Furthermore, most commercial chemicals contain

biologically significant impurities; as well, large numbers of naturally occurring chemicals in the food supply could be considered as candidates for testing. As it is not feasible, in terms of both money and skilled staff available, to test all of these chemicals and their impurities for their ability to induce cancer, it is critically important to determine priorities and to test the most important and potentially harmful chemicals.

Some groups of chemicals, such as food additives, pesticides, and drugs, are required to be tested by the standard protocols for carcinogenesis bioassay or combined carcinogenesis/chronic toxicity bioassay, because they are considered to affect the majority of the human population in the course of their use. The decision on which of the other chemicals require this expensive test for carcinogenicity depends on the level of human exposure, previous attempts to demonstrate carcinogenicity in humans or animals, knowledge of the biological properties of the chemical, and the relationship of the molecular structure of the substance under consideration to those of known carcinogens (i.e., structure-activity relationships).

A standardized approach to genotoxicity testing as a prelude to carcinogenesis bioassay or possible germ cell mutagenicity determination has been proposed by the Canadian Environmental Contaminants Advisory Committee on Mutagenesis. However, some 40% of the carcinogens identified by the U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program are lacking in genotoxic activity and do not fall into easily recognized structure-activity patterns compared with other carcinogens, illustrating the need for rapid tests for non-genotoxic carcinogens.

The cancer bioassay represents one of the most complex and one of the longest toxicological tests to be undertaken routinely. Every bioassay has to be conducted according to the Code of Good Laboratory Practice Regulations, which has done much to reassure evaluators that data from cancer bioassays are accurate but increases the costs of conducting tests for adverse toxicological effects. Several factors must be taken into consideration in the design of a cancer bioassay, including the form of the test chemical, the animal species and strain to be used, the routes of administration of the test chemical, the selection of dose to be administered, the number of animals to be used in the study, the test animals' diet, the avoidance of bias in the study, and the study duration. As well, special or substantially modified protocols for the detection of carcinogens, such as extended protocols (e.g., the combined carcinogenesis/chronic toxicity bioassay), mechanistic protocols (e.g., the initiation-promotion protocol), and rapid protocols (e.g., the mouse skin test), may be employed for a variety of reasons.

An assessment of exposure is necessary in order to estimate the risk from any substance. The basic overall principle behind an exposure assessment is that the person, group, or area being monitored should be as representative of the population being studied as possible. There are basically two types of monitoring studies: ambient monitoring and biological monitoring. Ambient monitoring measures the amount of a substance that is available for uptake and includes environmental monitoring, which is most commonly used for measuring pollutant levels in a given area in an industrial facility, and personal monitoring, or passive

dosimetry, which is normally conducted on three routes of exposure: dermal, inhalation, and oral (i.e., dietary exposure). Biological monitoring involves the measurement of a chemical or its metabolites in human biological tissue, such as blood, urine, and breath. The major advantage of biological monitoring over ambient monitoring is that it reflects exposure via all routes and from all sources. However, in order to interpret biological monitoring data, a thorough understanding of the pharmacokinetics of the substance is necessary. Modelling studies may also be conducted to determine exposure, but some models are extremely complex and difficult to validate, and it is important to conduct sampling to support the model.

There are many limitations to utilization of the data collected in exposure assessment. For example, estimates of human cancer risk are frequently based on experimental animal data obtained over exposure periods and exposure routes that may be quite different from the duration or route of exposure anticipated in humans. As well, most exposure studies utilize small sample sizes, and it is necessary to extrapolate to a large and variable target population. Another concern is that two population subsets are often not considered in exposure assessments – those that demonstrate excessive susceptibility to a particular compound, and those that are more highly exposed (e.g., children and industrial workers).

It has been customary to assume, not necessarily correctly, that an agent demonstrated to be a carcinogen in one or more surrogate animal species is potentially carcinogenic to humans. There are two major groups of problems to be addressed in comparing the carcinogenic effects of animal carcinogens with those to be expected in the human population. The first group concerns the way in which the test species and the test agent interact. The second concerns the fact that humans are usually exposed to much lower levels of the test agent than are experimental animals treated with the Maximum Tolerated Dose. The classical approach to the identification and classification of human carcinogens from animal bioassay data takes into consideration such factors as dose, pharmacokinetics, metabolism of DNA-interactive carcinogens, and the shape of the dose-response curve. Quantitative factors that may be used in carcinogenesis risk assessment include mathematical models of carcinogenesis, indices to describe the potency of chemical carcinogens, low-dose risk assessment to provide an indication of the level of risk posed at low exposure levels, pharmacokinetic models to describe the uptake, absorption, distribution, and elimination of xenobiotics, thus permitting estimation of the amount of the reactive metabolite reaching the target tissue, and quantitative interspecies extrapolation of carcinogenic risks, taking into account known species differences.

The process of chemical carcinogenesis may be separated into at least two phases, known as initiation and promotion. The process of cancer initiation involves converting the apparently normal cells of a tissue to cells that will, under appropriate circumstances, develop into tumour cells, a change that appears to be brought about by a chemically induced mutation or other genotoxic action of the initiating chemical. There is much less understanding of the way in which the initiated cells develop into cancer, although it appears that more than one

mechanism of tumour development or promotion is involved. Genotoxic carcinogens appear to have a greater ability to induce cancer than do non-genotoxic carcinogens, but this is not adequate, by itself, to imply that non-genotoxic carcinogens are unlikely to affect humans, and further testing must be performed to establish such a conclusion.

The weight of the evidence approach implies that regulatory officials assemble all the data on the agent under consideration and attempt to base their conclusions on the total package rather than rely solely on any individual item. This approach gives the evaluator or regulator the flexibility to challenge apparently inconsistent evidence and may also be valuable in the case of false-positive results – i.e., chemicals that would be predicted to be negative in humans but in fact give positive results in one or more bioassays in animals. This might occur in situations in which there are high yields of tumours in particular tissues in untreated animals or tissue-specific high-dose toxicity has intervened to enhance the process of carcinogenesis. Further areas of difficulty may be discovered in view of the intense research effort being directed to understanding the genesis of particular rodent tumours. The final regulatory decision taken depends on the adequacy of human and animal evidence available.

The determination that a chemical is an animal carcinogen and the weight of the evidence approach to assess the risk to humans are only the first stages in the management of a chemical carcinogen. There is also the need to assess the magnitude of the risk presented by the perceived or actual level of human exposure (risk assessment) and then to place this level of risk into the context of the legal mandate, economic factors, sociological considerations, and the possible public reaction to the perceived risk, before reaching a decision on the necessary level of regulation (risk management).

1. Introduction

1.1 Legislation and Control of Health Hazards

Most developed nations have legislation that permits them to regulate potentially toxic physical and chemical agents to which humans may be exposed. In Canada, as in many other countries, separate Acts address requirements in respect to the occupational setting, food, drugs, pesticides, and the general environment. Canadian legislation permitting the Health Protection Branch to regulate hazardous agents is listed in Table 1-1.

In several cases, these Acts give more than one government agency responsibility in the area of concern. The Pest Control Products Act, for example, vests the primary responsibility for the safety and efficacy of pesticides in Agriculture Canada, but Health and Welfare Canada must be assured under the Food and Drugs Act that residues in food crops do not present a hazard to consumers.

Cancer, whatever the cause, is a much feared disease. The following text attempts to explain what is meant by the terms cancer and carcinogenesis, how the ability of a chemical or product to induce cancer in humans or animals may be assessed, and how the regulatory official uses the evidence that a product induces cancer before drafting regulations to protect the public health.

1.2 Cancer: The Nature of the Problem

1.2.1 Mortality and Morbidity in Canada

In 1990, an estimated 29 900 men and 24 000 women died from cancer in Canada. During 1988, cancer caused 27% of all deaths. Increased cancer death rates over the past 20 years were almost entirely due to cancer of the lung. Over 80% of lung cancers are caused by cigarette smoking. If lung cancer is excluded, death rates for all other cancers decreased rather than increased in women and increased only slightly in men.

Cancer may occur in practically any tissue. Canadian cancer statistics (Canadian Cancer Society 1990) indicate that the following tissues were estimated to develop more than 1000 fatal cancers in both men and women in 1989: lung (17 300 cases; 14 200 deaths), colorectum (15 100 cases; 5700 deaths), lymphomas (5800 cases; 2700 deaths), and pancreas (2750 cases; 2700 deaths). Cancer is also prevalent in sex-related tissues, such as the prostate (10 300 cases; 3300 deaths) in men and the breast (13 400 cases; 4900 deaths) and uterus (4500 cases; 940 deaths) in women. It is known that at least some of these cases develop because of lifestyle (e.g., cigarette smoking and nutrition), occupation, medical

history, or the level of contamination of the individual's environment. Cigarette smoking is the major cause of some 80-90% of all human lung cancer cases and is a major cause of cancer of other sites, such as urinary bladder cancer.

Table 1-1
Legislation permitting the Health Protection Branch to regulate hazardous substances in food, drugs, and the environment

The National Health and Welfare Act
The Food and Drugs Act
The Radiation Emitting Devices Act
The Hazardous Products Act
The Atomic Energy Control Act
The Clean Air Act
The Canadian Labour Code
The Broadcasting Act
The Canadian Environmental Protection Act
The Pest Control Products Act

Cancer is infrequent in individuals between 15 and 20 years of age; except for childhood cancers with a strong genetic association, as is the case with bilateral retinoblastoma and leukemia related to Down's syndrome, it becomes more frequent as the individual's age increases. Cancer is a leading cause of death in the young (0-15 years).

1.2.2 What is Cancer?

Cancer may be regarded as a collection of diseases in which a series of common adverse properties is expressed in different tissues. Rupert Willis (1960) defined the essential element of cancer:

A tumour is an abnormal mass of tissue, the growth of which exceeds and is uncoordinated with that of the normal tissue, and persists in the same excessive manner after cessation of the stimuli which evoked the change.

While this definition reflects the essential biology of the cancerous process, it makes no attempt to cover any of the many peculiar properties of a tumour, such as malignancy or benignancy.

A tumour is said to be malignant if it has the ability to invade adjacent tissues or to metastasize to distant tissues, where it grows into a secondary tumour. Cells with such abilities often contain abnormalities of the cell nucleus or other cellular constituents; this gives the pathologist a further property on which to base the diagnosis of malignancy. Although the growth of the primary tumour may, among other factors (Evans 1989), deprive the rest of the body systems of essential

nutrients and thus lead to the wastage that is so often associated with advanced cancer, it is the destruction of vital systems by invasion or metastatic growth that may be fatal in many cases.

Benign tumours, in contrast to malignancies, lack the ability to invade or metastasize. They simply grow and may compress tissues that lie in the path of this growth. Benign tumours are, in general, much less life threatening than malignancies. They may compress and impede the action of vital tissues or may rupture blood vessels.

1.2.3 Cancer Causation

Because cancer is so prevalent and because it is a painful and eventually a killing disease, there has been much effort during the course of this century to determine why cancer arises and whether the disease is preventable. Some cancers, in humans and animals, are now recognized to be due to one or more of at least four different classes of agents: viruses, radiation, certain physical agents, and specific chemicals.

1.2.3.1 Viruses

The importance of viruses as inducers of tumours (oncogenic viruses) is perhaps best illustrated by avian leucosis, which, until hygiene improved and suitable vaccines were available, devastated parts of the poultry industry on a periodic basis. Evidence that human cancer is virally induced is both more recent and considerably less abundant. Burkitt's lymphoma (EB virus) and certain human leukemias have a viral etiology, and it is interesting to note that these viruses are similar to that which induces acquired immune deficiency syndrome (AIDS). More importantly, it has been recently shown that groups of human and animal tumours may contain sequences of DNA bases that closely resemble those of certain oncogenic viruses. The normal tissues from which these tumours derive also contain DNA base sequences that may be converted to the type found in tumours by a simple point mutation or the transposition of the DNA to a different site in the genome. The DNA base sequences found in tumours have been named oncogenes; those in the normal tissues have been named proto-oncogenes (Klein and Klein 1984; Barbacid 1986; Ramel 1986). The inhibition of suppressor genes that control the expression of oncogenes has been discussed by Klein (1987).

1.2.3.2 Radiation and Radioisotopes

Significant exposure to ionizing (high-energy) radiation has been found to be hazardous. There are numerous examples of humans developing cancer as a result of exposure to radiation. These range from exposure to the effects of atomic bombs, work in uranium mines or any other mines that have a high atmospheric level of trapped radon gas (see Chapter 2), and the medical use of X rays or radioisotopes.

Ultraviolet light is a natural component of sunlight. It has a lower energy than ionizing radiation and, in consequence, does not penetrate the tissues of the body. It has been identified as a widespread human skin carcinogen. Ultraviolet radiation induces mainly basal cell carcinomas of the skin that are often easily removed by minor surgery and consequently are incompletely enumerated because of incomplete reporting. Ultraviolet radiation also induces squamous cell skin carcinoma and malignant melanomas, which are among the deadliest human tumours. These tumours are currently increasing in frequency. There is a small number of people with the genetic disease xeroderma pigmentosum who are unable to repair their DNA if it is damaged by ultraviolet radiation and are consequently very much more susceptible to the adverse effects of this form of radiation. They develop many more sunlight-induced skin cancers than the general population.

1.2.3.3 Physical Agents

The implantation of a wide variety of materials, including metals, plastics, glass, or natural products, into the subcutaneous tissues of rodents leads, after a long latent period, to the induction of sarcomas. No such tumours appear to have been reported in humans surgically implanted with prostheses of various sorts.

Asbestos could be considered a physical carcinogen. Inhalation of asbestos fibres that are of a suitable size and shape to penetrate the smallest air passages in the human lung is followed many years later by the appearance of mesotheliomas (lining cell cancers) of the pleura of the lung and peritoneum, as well as lung cancers in humans (and a similar range of tumours in asbestos-treated animals). High incidences of these cancers have been described in asbestos textile workers, those working with internal insulation in ships, and a variety of other circumstances involving the use of asbestos (Selikoff and Lee 1978).

1.2.3.4 Chemicals

Several hundred chemicals have been shown to induce cancer in laboratory animals (IARC 1987); in specific instances, it is known that the same chemicals are similarly effective in inducing cancer in humans. The history of the early development of chemical carcinogenesis has been reviewed on many occasions (Clayson 1962; Clayson and Krewski 1990) and is not repeated here. Furthermore, in the past 40 years, a great deal of research effort has been devoted to determining why and how cancer may be induced by certain chemicals and whether surrogate species are always adequate predictors for the human disease. It now appears that if carcinogen identification and its extrapolation to humans are to be accurately accomplished, it is essential to develop a sounder understanding of the carcinogenic processes.

1.3 Definitions

A number of attempts have been made to define the meaning of the term carcinogen. Each of these definitions is operational – that is, based solely on one or more individual observations without any attempt to understand the general basic processes involved. For the purposes of this text, the following definition will be used (Clayson 1987):

A carcinogen is an agent that significantly increases the rate of formation of malignant tumours, or under appropriate circumstances both benign and malignant tumours, in a population. The change in rate of formation of tumours may be reflected by an increase in the number of tumours, a decrease in their latency, or a combination of both these factors.

The problem of when it is and when it is not appropriate to combine benign and malignant tumours is complex, requiring pathological consideration in the bioassay procedure.

A great deal of work, commencing with that of Rous and Kidd (1941) and Berenblum and Shubik (1947a, 1947b, 1949), has demonstrated that, in many tissues (Pitot and Sirica 1980; Weinstein 1985), the process of carcinogenesis may be divided into at least two distinct phases (see Sections 4.2.9.2 and 6.2). The first two of these processes to be firmly identified have been called initiation and promotion and have been defined as follows:

Initiation is a relatively rapid and apparently irreversible process that results in cells of the affected tissue being, under appropriate conditions, able to develop into tumours.

Promotion is a slower phase in which the repeated administration of a non-carcinogen gives rise to tumours in a preinitiated tissue.

Although all complete carcinogens may exhibit a promotional action, the strict definition of the term "promotion" can be fulfilled only by an agent that does not induce high yields of tumours in its own right.

A third overall phenomenon in carcinogenesis was addressed by Foulds (1969) on the basis of his personal clinical and experimental observations:

Progression is the stepwise and irreversible increase in the malignancy of an individual tumour.

2. Epidemiology

2.1 Role of Epidemiology

The poet Alexander Pope opined that "The proper study of mankind is man." Epidemiology is the study of the occurrence and causes of human disease. The objective of epidemiology is to provide information to prevent or control health problems in human populations. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has concluded that sufficient evidence of carcinogenicity in humans can be provided only by human studies. This chapter describes the types of epidemiological investigation that are used to determine cancer risks directly in humans, with examples of studies conducted by Health and Welfare Canada.

IARC (1987) noted that epidemiological evidence of carcinogenicity in humans comes from three main sources:

1. Case reports of clusters of individual cancer patients who have been exposed to the carcinogen.

2. Descriptive epidemiological studies in which the incidence of cancer in human populations was found to vary by place or time in relation to exposure to the agent.

3. Analytical epidemiological studies in which individuals' exposures to the agent were found to be associated with an increased risk of cancer.

2.2 Principles of Epidemiology

IARC (1987) has specified three criteria that must be met before a causal association can be inferred between exposure and cancer in humans:

1. There is no identifiable bias that could explain the association.

2. The possibility of confounding factors has been considered and ruled out as explaining the association.

3. The association is unlikely to be due to chance.

In general, although a single study may be indicative of a cause-effect relationship, confidence in inferring a causal association is increased when (i) several independent studies are concordant in showing the association, (ii) the association is strong, (iii) there is a dose-response relationship, (iv) a reduction in exposure is followed by a reduction in the incidence of cancer, (v) exposure clearly precedes the development of cancer, and (vi) there is supportive animal or *in vitro* evidence. The degrees of evidence for carcinogenicity in humans were categorized by IARC (1987) as sufficient evidence, limited evidence, inadequate evidence, and evidence suggesting lack of carcinogenicity.

2.3 Case Reports

Case reports may suggest associations with specific exposures. Such case reports have frequently been the first sign of a possible causal link between cancer and exposure to a chemical (e.g., soot). Such reports also provide evidence for carcinogenicity when animal studies are positive but are unappreciated (e.g., vinyl chloride). Case reports have identified several industrial processes that cause cancer in humans (e.g., manufacture of magenta) but are not readily amenable to carcinogenicity testing in animals. However, case reports do not provide conclusive evidence of carcinogenicity.

2.4 Descriptive Epidemiology

Descriptive epidemiology is the study of the distribution of disease by population, place, and time. Such studies serve to identify high-risk subgroups defined by such characteristics as sex, age, occupation, geographic area, education, and income. Descriptive studies have an essential role in the generation of hypotheses about the causes of disease, the assessment of the health status of populations, and the impact of disease control programs.

2.4.1 Bladder Cancer Among Aluminum Refining Workers

Surveillance of Canadian cancer incidence data by the Laboratory Centre for Disease Control revealed a significantly high incidence of bladder cancer in the Chicoutimi region of Quebec (Wigle 1977a). Eighty-one newly diagnosed cases of bladder cancer were recorded between 1969 and 1973, but only 51 were expected based on Quebec incidence rates. The ratio of the numbers of male to female cases was almost 11:1, much higher than the national average of 4:1. The largest relative and absolute excess of bladder cancer cases was in men 45-64 years of age. This suggested that occupational exposures could be responsible.

The aluminum industry in the Chicoutimi region employed 54% of the men in manufacturing industry. It relied mainly on the Soderberg process, which uses anodes made of a mixture of coke and coal pitch. Coal tar pitch produces aromatic amines when heated (Clayson 1976). This class of chemicals is associated with human bladder cancer. The release of volatile hydrocarbons, including benzo(a)pyrene, from such anodes under the high temperatures of the refining process has been reported (Livingstone 1953, cited in Konstantinov and Kuz'minykh 1971). A mortality study of roofers, who are exposed to benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons, also revealed elevated risks of bladder and lung cancers among men exposed for at least 20 years (Hammond *et al.* 1976).

The results of a case-control study of bladder cancer (Thériault *et al.* 1981) showed an increased bladder cancer risk associated with employment in the electrolysis department of the aluminum refining plant in Chicoutimi. The

company accepted this finding, introduced the use of different and "safer" electrodes, improved the ventilation, required protective masks, and initiated a urine cytology program for the early detection of bladder cancer.

2.5 Ecologic Studies

Ecologic or correlative epidemiological studies involve statistical analyses of the relationship between exposure status for one or more factors and the risk of a disease within groups, such as communities or geographic areas, rather than individuals. An association between exposure and disease is then held to indicate a possible causal effect. Ecologic studies cannot control adequately for possible confounding factors, such as occupation, diet, and lifestyle, and their results serve primarily to suggest the need for more rigorous analytic epidemiological studies.

2.5.1 Breast Cancer and Fertility Trends

Breast cancer death rates among Canadian women 30-69 years of age were inversely correlated with the proportions, by province, of women first married at ages 15-19 (Wigle 1977b). In addition, breast cancer mortality and incidence rates for women 40-59 years of age were significantly and negatively correlated with their fertility rates at ages 20-24. These data support other studies that indicate that early pregnancy protects against breast cancer. The sharp decline in fertility rates since 1960 as well as delays in first pregnancy may result in an increased incidence of breast cancer in the future.

2.5.2 Variation by Income Level in the Risk of Death Due to Cancer

The risk of death due to cancer was analyzed for Canadians in five categories defined by median household income (Wigle and Mao 1980). Among adults aged 35-64, persons in the lowest income category had substantially higher risks than the highest income group for cancers of the mouth and pharynx, esophagus, stomach, large intestine (men), larynx (men), lung (men), uterine cervix (women), and body of the uterus (women).

These variations are at least partially attributable to the fact that persons in the lowest income category are more likely to be exposed to the known risk factors for these cancers (e.g., smoking, alcohol, suboptimal diets, occupational carcinogens, multiple sex partners, obesity). The highest income category had elevated risks for ovarian cancer only; this was probably partially due to the higher prevalence of previous pregnancy, which is protective for this cancer, among low-income women.

2.6 Case-Control Studies

Information on exposure to potential causal factors is obtained after the fact from cases and from unaffected individuals (controls). The sampling of diseased subjects, coupled with methods to collect exposure information retrospectively, makes this design well suited to testing etiologic hypotheses for relatively rare diseases.

Reliable information on exposures (e.g., prescription drug usage and dietary habits) may be difficult to obtain, especially when it is necessary to look 20 or more years into the past for diseases like cancer. Nonetheless, case-control studies have been able to identify many hazards, such as vaginal cancer in young women whose mothers were given the synthetic hormone diethylstilbestrol (DES) to treat threatened abortion (Herbst *et al.* 1971). Mothers of cases were more likely to have had prior pregnancy loss or bleeding during the relevant pregnancy: this was an indication for use of DES. The main difference between mothers of cases and mothers of controls was the exposure to DES during the relevant pregnancy; seven out of eight mothers of cases were exposed, compared with 0 of the 32 mothers of controls. This association was confirmed in subsequent larger epidemiological studies.

2.7 Cohort Studies

In cohort studies, information concerning the fact and level of various exposures in the study population, which is usually selected to be disease-free, at least with regard to the disease(s) studied, is obtained at the outset. The population is then monitored over a period of time. The length of follow-up required is a function of the cohort size, the background incidence rate of the disease(s) of interest, the desired relative risk detection limit, and the average "latent" period between first exposure and onset of disease. Often, historical exposure records (e.g., occupational exposure histories) are used, with the strong advantage of reducing the required follow-up time. Health outcome status is usually based on searches of health record files, such as death certificates, cancer registries, and hospital admissions. The direct sampling of subjects with variable exposures, coupled with a plan of recording health effects as they occur, is appropriate for relatively common conditions, such as coronary heart disease, motor vehicle injury, common infections, or death from all causes combined.

In studies of cancer, the follow-up time required may be several decades unless large populations are recruited. Many thousands of person-years of observation are required for the study of relatively rare diseases. Cohort studies have demonstrated that smoking doubles the overall death rate and, more recently, provided evidence of increased lung cancer mortality among passive smokers.

2.7.1 Radiation-induced Lung Cancer in Newfoundland Fluorspar Miners

Mining of fluorspar in St. Lawrence, Newfoundland, began in 1936 and continued until 1978. In the early 1950s, the growing number of lung cancer deaths among miners alerted health officials to the problem; in 1960, Health and Welfare Canada conducted measurements that revealed high levels of radon and its daughter products in the mine air. Levels were as high as 190 "working levels" (WL) (in contrast to the current standard of 0.3 WL). Tests revealed the presence of radon in the large quantity of water that seeped into the mines, presumably from natural uranium deposits. In 1960, mechanical ventilation was introduced into the mines, and levels of radon daughters in the air fell to well below the permissible standards of the time.

Recently, Health and Welfare Canada extended the study of these miners (Morrisson *et al.* 1988). The study cohort comprised 1772 underground miners and 352 surface workers who were employed by one of two local mining companies from 1933 to 1978. Occupational histories were compiled, and smoking habits were determined. In total, 445 deaths were recorded among underground workers from 1950 to 1984. Of these, 185 were from cancer, of which 113 were lung cancers. The observed numbers of cancers of the lung, salivary gland, and buccal cavity and pharynx were significantly elevated. Deaths from chronic obstructive lung disease and accidental falls were elevated, but not significantly so. Lung cancer risk increased with increasing cumulative radiation dose. The lung cancer risk for men in the highest exposure category was over 30 times that for the provincial male population. The exposure-risk relationship was strong and statistically significant.

2.8 Intervention Studies

Intervention studies involve the random allocation of persons or groups to "treatment" and "control" categories to compare the effect of an intervention (e.g., dietary fat reduction *vs* no intervention) on health status (e.g., risk of breast cancer). The National Breast Cancer Screening Trial, costing almost $20 million over a period of 10 years, has involved 90 000 Canadian women aged 40-59. The study has two main goals: (i) to assess the effect on risk of fatal breast cancer of physical examination and mammography versus no intervention for women aged 40-49, and (ii) to assess the effect on risk of fatal breast cancer of physical examination and mammography versus physical examination alone for women aged 50-59. If successful, these interventions may be applied on a systematic basis to reduce morbidity and premature death through early detection and treatment of breast cancer.

2.9 Interpretation of Epidemiological Studies

The strength of epidemiological studies may be judged through the consideration of a number of factors. These are illustrated by consideration of the effects of "passive" smoking – that is, the effects on non-smokers of living in an environment contaminated by cigarette smoke (Wigle *et al.* 1987).

The *strength of the association* between passive smoking and lung cancer is by no means as great as with active smokers; nevertheless, it is reasonably *consistent* in the level of risk that has been demonstrated over a series of studies, particularly insofar as those non-smoking women whose husbands were heavy smokers are concerned. Similarly, *temporality*, or the demonstration of increased risk with increased time of exposure to the noxious agent, is important. This, again, has been demonstrated to occur with passive smokers. Increased involuntary exposure to cigarette smoke (*biological gradient*) has similarly been shown to increase the risk of lung cancer.

The *biological plausibility* of the association is supported by the fact that sidestream cigarette smoke contains many known carcinogens, some of which have not been detected in that part of the smoke inhaled by active smokers. Furthermore, the *analogy* between the effects of passive and active smoking considerably strengthens the level of confidence in the validity of an association between passive smoking and lung cancer. Considerations similar to those mentioned in this section are applied to the assessment of most series of epidemiological studies.

3. Selection of Chemicals for Carcinogenesis Bioassay

It has been estimated that there are about 70 000 individual chemicals in commercial production and use, and that over 40 000 are used in commercially significant quantities. There are about 1000 new or replacement chemicals being introduced each year. About 6000 of these chemicals have so far been tested for toxicity, although not all have been extensively evaluated. Furthermore, most commercial chemicals will contain one or probably more biologically significant impurities. There are also large numbers of naturally occurring chemicals in the food supply that could be considered as candidates for testing.

It is not feasible to test all of these chemicals and their impurities for their ability to induce cancer. A single bioassay on just one chemical is extremely costly in terms of the financial outlay – approximately $2.5 million for each substance – and is difficult to perform, because the trained personnel and adequately designed facilities are not available. It is currently possible to test only about 150-200 chemicals annually, on a world-wide basis, for their cancer-inducing ability. This position is unlikely to be remedied, even by massive infusions of money into the problem, for the skilled staff is not available. It is critically important for the product sponsor and the regulator to determine priorities and to test the most important and potentially harmful chemicals.

This section addresses some of the non-mechanistic considerations that help in the selection of substances for cancer bioassay.

Some groups of chemicals, such as food additives, pesticides, and drugs, are required to be tested by the standard protocols for carcinogenesis bioassay or combined carcinogenesis/chronic toxicity bioassay. Protocols described in the Organization for Economic Co-operation and Development's (OECD) "Guidelines for the Testing of Chemicals" (OECD 1984) are normally adequate. It is also required that the OECD Code of Good Laboratory Practice (GLP) be used (OECD 1982; Health and Welfare Canada 1990).

Drugs, pesticides, and food additives are treated in this fashion because they are considered to affect the majority of the human population in the course of their use. The decision on which of the other chemicals require this expensive test for carcinogenicity depends on the level of human exposure, previous attempts to demonstrate carcinogenicity in humans or animals, knowledge of the biological properties of the chemical, and the relationship of the molecular structure of the substance under consideration to those of known carcinogens. Although human exposure could be roughly related to production figures, this is no substitute for the detailed analysis of actual or perceived exposures for each component of the use pattern of the substance (see Chapter 5). These are critical to both the decision on whether or not a chemical should be tested for carcinogenicity and the regulatory decision on the chemical if it is shown to induce cancer in rodents.

3.1 Assessment of Previous Data

The standard and comprehensiveness of the cancer bioassay have materially increased in recent years. The introduction of Good Laboratory Practices (U.S. Food and Drug Administration 1976; OECD 1982; U.S. Environmental Protection Agency 1983a, 1983b) has made it possible for the regulatory scientist to reconstruct the entire course of an experiment from an audited paper trail set up at the time the experiment was conducted. The standard of animal care has greatly increased during the last 30 years, and the animals are healthy and often live longer.

3.2 Utility of Genotoxicity Data

The Canadian Environmental Contaminants Advisory Committee on Mutagenesis (1986) proposed a standardized approach to genotoxicity testing as a prelude to carcinogenesis bioassay or possible germ cell mutagenicity determination. This is based on "levels of concern" and represents a minimum requirement. All chemicals will be investigated in one *in vitro* mutagenicity assay, such as the Ames *Salmonella* microsome test, and in one *in vitro* mammalian cell assay for chromosomal aberrations. With chemicals that are considered to be of the lowest concern, these two assays will suffice if the results are negative. With chemicals that are of greater concern, and possibly with those of lower concern that have given positive results in the *in vitro* assays, at least one *in vivo* chromosome aberration test will be mandatory. If this *in vivo* test is positive, the substance is a prime candidate for a carcinogenicity bioassay; a negative result, however, would suggest that no bioassay is required on the grounds of genotoxicity even if the *in vitro* tests were positive.

The scientific rationale for the emphasis on *in vivo* tests rests on the fact that the *in vitro* methods for genotoxicity testing tend to distort a number of the processes that lead to positive results, thus making the *in vitro* tests both exquisitely sensitive and, at the same time, relatively inadequate predictors for the results of the carcinogenesis bioassays in living anin als (Douglas *et al.* 1988). This sensitivity appears to underlie some of the relatively unsatisfactory correlations that have been reported in comparing *in vitro* genotoxicity tests and cancer bioassays (Ashby and Tennant 1988).

3.3 Tests for Non-genotoxic Carcinogens

Some 40% of the carcinogens identified by the U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program (NCI/NTP) are lacking in genotoxic activity (Ashby and Tennant 1988) and do not fall into easily recognized structure-activity patterns compared with other carcinogens. These chemicals cannot, therefore, be recognized by the use of routine genotoxicity tests. Some of them, like asbestos, are carcinogenic in humans. There is a need for rapid tests for non-genotoxic carcinogens.

Fully defined and validated tests for these compounds have not yet been developed. Some of these chemicals may be promoting agents that act on cells that have previously been initiated in the test animal by one means or another. A test has been developed to recognize some of these cancer promoting agents. It is known as the cell-to-cell cooperation assay (Yotti *et al.* 1979) and depends on the fact that cells growing in culture cooperate with each other in ensuring that their common needs are met. Addition of a promoting agent prevents this cooperation and thereby makes some cells less easily able to withstand the effects of specific toxic agents than others. This susceptibility may be recognized by the appearance of the cells and the results scored.

Alternatively, the close examination of changes observed in the *in vivo* subchronic study preceding the full cancer bioassay may sometimes provide information about those chemicals that appear to be possible non-genotoxic carcinogens. Butylated hydroxyanisole, for example, induced a sustained high level of proliferative and inflammatory reactions in that part of the forestomach from which the tumours eventually appeared. The induction by the chemical of high levels of cellular proliferation as a spur to cancer formation is a concept that has been suggested to be applicable in the identification of some non-genotoxic carcinogens (Clayson *et al.* 1986; Clayson 1987).

3.4 Structure-activity Relationships

Structure-activity relationships (SARs) are commonly used in pharmacology and toxicology to predict chemical structures that have the ability to perform certain functions. Because carcinogenesis is a multistage process, SARs tend to become more complicated than with simpler processes – e.g., the inhibition of specific enzymes, such as acetylcholinesterase, by certain pesticides. Certain chemical structures are often, but not always, associated with carcinogenic activity. These include such compounds as polycyclic aromatic hydrocarbons, aromatic amines and related chemicals, N-nitroso compounds, and biological alkylating and arylating agents.

Although SARs are of great value in the pharmaceutical industry in deriving new products effective against very specific targets, this is not always the case with carcinogens. A carcinogen may induce cancer by different mechanisms in different tissues of the same species. The regulator must use SARs with care. SARs are most useful if the candidate chemical contains one or more of the key groups associated with the induction of cancer. In such cases, the known carcinogenicity or non-carcinogenicity of structurally related compounds may be sufficient to give a possible indication that the chemical is, or is unlikely to be, a carcinogen (Enslien 1987). Recent approaches using computer-based artificial intelligence to break out critical substructures in carcinogenic molecules promise greater success (Rosenkranz and Klopman 1990).

3.5 Conclusions

In general, newly introduced chemicals will be judged more stringently than those that have been in the human environment for some time. This is because presence in the environment means that there has been some human experience with the agent, and because a new chemical has the capability to increase the level of human risk unless there are adequate human data to suggest otherwise.

4. Conduct of the Cancer Bioassay

The cancer bioassay represents one of the most complex and one of the longest toxicological tests to be undertaken routinely.

4.1 Good Laboratory Practices

In 1976, the U.S. Food and Drug Administration introduced the Code of Good Laboratory Practice Regulations. Other national and international agencies have followed suit (OECD 1982; U.S. Environmental Protection Agency 1983a, 1983b). As a result, every non-clinical study made in support of a regulatory submission has to be conducted according to the Code of Good Laboratory Practice Regulations, if it is to be accepted by regulators in the United States and many other countries.

The study director is responsible for the preparation of the study design for approval by management, the conduct of the study, and the initial evaluation of the resulting data. Management is required to provide the study director with the necessary personnel, facilities, and resources for the successful completion of the study and its interpretation.

A detailed protocol for the study must be prepared that includes the purpose of the study, how it will be achieved, and a list of all staff and their qualifications. The component parts of the protocol are set out as Standard Operating Procedures (SOPs). SOPs are required for each procedure in the study, such as cage washing; maintenance of the temperature, humidity, and controlled lighting of the animal quarters; weighing animals; performing analytical procedures; preparing slides; and making pathological assessments of the tissues provided by the study. A GLP study is subject to two forms of monitoring: (i) by a management-appointed internal group, and (ii) by an external government-appointed audit team. GLP is voluntary in Canada at the moment; however, the Health Protection Branch ensures that, wherever possible, its studies are carried out under GLP protocols.

A recent development in GLP has arisen from the growing use of computers to collect, store, retrieve, and analyze experimental data resulting from toxicology and other studies. Computer technology is of great value in complex studies like the cancer bioassay, which may generate several million individual items of information. Any computer-based program that is used must, however, be validated to ensure that it does what is intended and does not lose or unintentionally alter raw data.

The advent of GLP has done much to reassure evaluators that the data from studies like the cancer bioassay are accurate. GLP has, however, increased the costs of conducting tests for adverse toxicological effects.

4.2 Design of the Bioassay

4.2.1 The Test Chemical

It is customary in regulatory bioassays to use the product to which the public will be exposed. Thus, in the case of food additives, the food-grade chemical is used; in the case of pesticides, it is usual to use the technical grade that is representative of the material used in the environment. These chemicals may not approach chemical purity, and, in consequence, it is first necessary to characterize comprehensively the chemical to be investigated. The nature and levels of the impurities in the test chemical should be surveyed to ensure that there are no biologically significant levels of known or suspected carcinogens in the product.

It is necessary to establish that the laboratory animals are being exposed to the test material and not to a series of its decomposition products. The stability of the test agent under the conditions of exposure in the medium in which it is to be applied must, therefore, be determined. Thus, if the chemical is to be given in the diet or drinking water, the stability of the substance in the diet or drinking water has to be determined, and fresh batches must be prepared as frequently as is necessary to avoid excessive decomposition or loss of the agent by evaporation. If the chemical is too unstable to be given in the diet or if it volatilizes from the diet to a significant extent, it is customary to give it by gavage despite the laboriousness of this procedure.

If the test agent is to be administered by inhalation, it is necessary to ensure that it is stable in air and is of a particle size capable of penetrating the smallest airways in the lung. For example, although metallic nickel is stable in a solid mass, some specially prepared, dispersed, and spongy forms of nickel, such as the hydrogenation catalyst known as Raney nickel, are pyrophoric and react actively with oxygen in the air.

Skin painting, subcutaneous injection, and intraperitoneal injection are much less frequently used than oral or inhalational administration in routine bioassays. They present fewer of the problems stressed in this section because solutions of the test agent may be freshly prepared immediately before administration. It must still be ensured that the test agent reaches the tissues in the intended dose and form, especially in the case of skin painting.

Criteria for the choice of the route of administration of a test chemical are discussed in Section 4.2.3.

4.2.2 Choice of Animal Species and Strain

Under ideal conditions, cancer bioassays would always be conducted in species that react to the test agent as similarly to humans as is possible. In practice, this is not feasible because of the costs of the bioassay and its necessary duration. Carcinogenesis should last for an appreciable part of the animal's lifespan; bioassays in dogs might have to last for 10 years or more before an acceptable

assurance of safety was attained, whereas 25 or more years would be needed in some species of non-human primates. Both these species are expensive to purchase and extremely costly to maintain.

The routine carcinogenesis bioassay demands the use of two surrogate species in case one fails to react to the carcinogenicity of the test agent; in practice, rats and mice are the usual choice, despite the fact that they are subject to high incidences of naturally occurring tumours in certain tissues. The hamster is less frequently used, except in some inhalational studies in which it has proved highly satisfactory and in assessing peroxisome proliferators. Strains and species of test animals that develop high yields of naturally occurring tumours (Tarone *et al.* 1981) should not be used in a carcinogenesis bioassay. Such tumours make it difficult to interpret the significance of induced tumours in the affected tissues.

4.2.3 Routes of Administration of the Test Chemical

The route of administration for a chemical in a cancer bioassay should most closely resemble the route of major exposure of the human population. Thus, food-related chemicals will be given in the diet. Pharmaceuticals will be administered by the route chosen for their administration to patients.

The route of administration has the potential to control the level and type of exposure of the tissues to the test agent. Test agents will attain their highest concentrations, in most cases, at their site of entry to the body. Thus, inhalation will lead to the greatest concentration in the lungs, painting to maximum skin exposure, and injection to maximum concentrations in local tissue.

After oral administration, food passes through the esophagus, may be stored in the rodent forestomach, and then passes through the gastric stomach into the intestine. Generally, maximum absorption occurs in the intestine, from where the agent is carried by the portal vein to the liver. The liver usually has the greatest potential of all the bodily organs to metabolize chemicals and thereby reduces the amount of the administered agent that reaches the tissues. In specific instances, however, the microbial flora in the intestine may extensively degrade specific test agents, such as azo-dyestuffs.

4.2.4 Dose Selection

Dose selection involves two problems. A major problem involves setting the highest dose to be administered to the test animals; an easier problem involves choosing the two or three lower doses to be used in a study. The difficulty in setting the highest dose level arises from the need to select a dose level that provides the highest probability of demonstrating tumours without shortening the lifespan or depressing the clinical condition of the test animal and, at the same time, is the highest dose possible to fulfill these conditions. If the highest tolerated dose level is not used, there is the danger that the repetition of the study at a higher, but tolerated, dose level will give a positive result, whereas the original but lower level failed to do so. This has a potential to reduce public

confidence in the testing and regulatory processes. The highest dose level that meets these criteria is called the Maximum Tolerated Dose (MTD) (National Toxicology Program 1984):

The maximum dose that, when given to animals for the duration of a carcinogenesis study, will not produce non-tumour effects on the longevity of the treated animals and will not result in a greater than 10% reduction in body weight as compared to concurrent controls. This dose should not cause morphologic evidence of toxicity that would interfere with the interpretation of the study.

The interpretion of non-tumour effects needs further thought and, possibly, a tissue-by-tissue listing of relevant and irrelevant lesions.

The information obtained from acute toxicity determinations is usefully employed by the experienced investigator to set levels for the 14- to 28-day study. In this study, the test agent is administered by the route chosen for the final bioassay, and the results serve for preliminary range finding. The subchronic 90-day study may be regarded as a dress rehearsal for the main carcinogenesis bioassay. Dose levels should be set so that at least one is likely to exceed the MTD. Clinical inspection, clinical chemistry, blood analysis, and urine analysis should be at least as thorough and as frequent as those to be used in the final combined carcinogenesis/chronic toxicity bioassay. Factors such as diet and body weight gained should be carefully assessed at weekly intervals, at least. At the termination of the test, a careful post-death examination of each test animal (necropsy) should be performed, and a full range of tissues should be submitted for preparation for pathological examination. The care with which these observations are made will determine the success of the entire carcinogenesis bioassay.

4.2.5 Number of Animals to be Used

The number of animals to be used in a carcinogenesis bioassay is usually set at about 50 of each sex at each dose level. An equal or greater number of untreated and, depending on the method of chemical administration, vehicle- treated control animals of each sex is maintained. These minimum numbers represent a compromise between what is desirable to protect the human population and what can be afforded if carcinogenicity testing is to be applied to a reasonable proportion of chemicals that need such testing (Gart *et al.* 1986).

4.2.6 Diet

The test animal's diet may influence many factors in the animal's response to a toxic agent during a bioassay. It is therefore essential that a standard diet be used in the bioassay. There are effectively three types of diet that may be employed in a cancer bioassay using rodents: a closed formula diet, an open formula diet, and a semi-purified diet.

Generally, demand feeding is used in carcinogenesis bioassays; that is, the treated and untreated animals are allowed free access to their food supply. It has been advocated (and indeed practised by some toxicologists) that a level of feeding restricted to 75-85% of the unrestricted level would be advantageous. As dietary restriction both reduces cellular proliferation and tumour incidences (Lok *et al.* 1988) and increases the test animals' longevity, it may introduce major complications into study interpretation.

4.2.7 Avoidance of Bias

Because of the high cost of cancer bioassays, it is extremely important that each bioassay is conducted as carefully and as accurately as possible. Every available opportunity should be taken to avoid bias in the study (Gart *et al.* 1986).

Randomization of animals is important, as even the most genetically similar animals may demonstrate minor inherited changes or characteristics due to differences in the environment in which they have existed since they were conceived.

Environmental randomization is a response to, for example, the fact that some animals may be a different distance from the light source in the animal room, or the possibility of drafts disturbing some animals more than others. The response to these kinds of possibilities is to circulate cage racks or the position of individual cages within the rack in a predetermined but random manner. If this refinement is adopted, it is essential that the study director ensures that staff are capable of responding to changes in cage position and do not give the diet to the incorrect animals. Some form of colour coding is of paramount importance.

Other factors that may introduce bias include the number of animals in a cage and decisions on whether or not sick animals in the study should be sacrificed. The number of animals in a cage may vary over the course of a bioassay due to attrition. For example, it has been known for many years that groups of 50 mice kept in a single cage develop fewer naturally occurring mammary tumours than do mice that are housed individually. This is because group-housed animals have to compete for their food supply, whereas singly housed mice do not. The best way to overcome this usually minor problem is to house all rodents individually.

4.2.8 Study Duration

As cancer incidences increase with age, a cancer bioassay should last for an appreciable part of the test animals' expected lifespan: two years for rats, and 18-24 months for mice and hamsters. The observation that rats used in cancer bioassays have, over the past decade, both increased body weight and decreased longevity may affect the future duration of the bioassay.

4.2.9 Special Protocols

Special or substantially modified protocols for the detection of carcinogens may be employed for a variety of reasons.

4.2.9.1 Extended Protocols

The combined carcinogenesis/chronic toxicity bioassay, as described by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD 1984), is an attempt to study both end points in a single bioassay. It involves adding additional groups of animals at each dose level of the carcinogenesis bioassay for sacrifice at predetermined times for the study of the development of chronic lesions under the influence of the test agent. It is recommended by the Health Protection Branch because it economizes overall in the use of animals.

The two-generation (conception to death) protocol found favour in the 1970s as an ideal way to mimic human exposure to chemicals, such as food additives, environmental pollutants, and drugs. These chemicals have the ability to expose humans at every stage of development and in adult life. In the two-generation protocol, groups of 50 or more male and 50 or more female animals are exposed to selected levels of the test agent for 60 or more days and then mated. After successful mating, the males are sacrificed. The female parent animals are continued on their respective diets until pregnancy, suckling, and weaning are complete. The infants then receive the same diets until the termination of the experiment. In this way, continuous exposure is assured from conception to death in the offspring.

There are two major technical problems in this approach to a bioassay. The first arises from the fact that the developing organism (fetus, neonate, and infant) demonstrates marked changes in biochemistry and physiology compared with the adult, and, consequently, toxic responses differ. Secondly, the investigator has to select one or two animals of each sex from each litter to complete the offspring study groups.

4.2.9.2 Mechanistic Protocols

The initiation-promotion protocol is intrinsically simple. At its simplest, it requires four groups, usually of 20-40 animals each. Two of these groups are either treated with a single dose or administered a carcinogen over a certain time period. After an interval that may range from one day to several weeks, one of these treated groups and one untreated group are given the putative promoting agent repeatedly or continuously until tumours appear. An overall increase in the number of induced tumours, which may be malignant or benign, is held to identify the test chemical as a promoter. Cancer promoting agents are generally applied over most or all of the time it takes the promoted tumours to develop. If benign, these induced tumours often regress when the promoting treatment is

withdrawn. In consequence, the evaluator of such results will have great difficulty in applying such promotional data to chemicals to which humans are exposed for much more limited periods.

4.2.9.3 Rapid Protocols

Rapid protocols are of very limited utility for regulatory purposes, as they are tissue specific – e.g., the Strain A mouse lung adenoma test (Shimkin and Stoner 1975), the rodent liver focus test, or the mouse skin test – and may depend on the augmentation of a high background incidence of tumours in the specific tissue. This makes them difficult to interpret. They will not be discussed further.

4.3 Practical Considerations

The care of animals in a bioassay (Arnold *et al.* 1990), their postmortem examination and the pathological examination of the tissues (Hardisty and Eustis 1990), and the subsequent statistical analysis of the results (Krewski and Franklin 1991) have each been previously described in detail. The reader requiring further information in these areas is referred to these and other accounts.

5. Determination of Human Exposures

5.1 Role of Exposure Assessment

An assessment of exposure is necessary in order to estimate the risk from any substance. The adverse effect may be identified through toxicological studies in non-human test systems or from epidemiological studies. Exposure assessment can be defined as the study of the amount of a substance that comes into contact with a living system, and risk is the probability of an adverse effect occurring. The reliability of the risk assessment is dependent on many variables, including the relevance of the test system and adverse effect and the validity of extrapolating both the route and duration of exposure from animal studies to the anticipated human exposure.

For example, carcinogenicity or chronic effects noted in lifetime toxicology studies are most appropriately utilized in estimating human risks associated with chronic exposure to the toxic insult. Routes of exposure should, wherever possible, be similar as well. Human risks associated with occupational dermal exposure are often difficult to estimate from rodent studies in which the route of exposure is usually oral. Although adverse effects observed directly in human populations are not subject to species extrapolation, such effects are frequently the result of exposure that may have taken place many years previously, rendering accurate exposure estimates virtually impossible.

As pointed out by Severn (1987) in his discussion of exposure assessment in cancer risk assessment, exposure calculations quantitate separate contributions to exposure by oral, dermal, and inhalation routes and describe the time dependence of exposure. The source of the chemical should also be identified. There are many different sources of exposure to chemical and physical agents, including the workplace, food, drinking water, consumer products, disposal, transport, and the ambient environment. Internationally, guidelines have emerged that recognize the divergent types of data required, depending on the source of exposure. They also provide a comprehensive focus of past and present sampling and analytical procedures for various groups of substances (IARC 1984; U.S. Environmental Protection Agency 1986, 1987b; U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens 1986; U.S. Congress Office of Technology Assessment 1987).

Although an examination of all sources of exposure and monitoring methods is beyond the scope of this report, we will concentrate on the assessment of occupational exposures and food exposures to potential cancer-causing agents. Occupational exposures have the potential to be relatively large and arise by contamination of the worker by a variety of routes; exposure through food tends to occur in relatively small doses over long periods of time.

This chapter will deal with how human exposure is determined, the limitations in the current state of exposure assessment, and the special issues involved in using exposure estimations to assess the risk of cancer to human populations.

5.2 Principles of Exposure Assessment

The basic overall principle behind an exposure assessment is that the person, group, or area being monitored should be as representative of the population being studied as possible. For example, in order to estimate occupational exposure to a farmer using a pesticide, the farmer should be monitored during a full work day while he/she carries out all his/her normal activities and while he/she wears normal work clothing. The monitoring should also be carried out when there is a reasonable possibility of exposure.

The U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens (1986) listed five principles for exposure assessment:

1. It is desirable that exposure routes employed in animal health effects studies are comparable to human exposure routes... because there may be important route-dependent differences in molecular, biochemical, and physical parameters in organs.

2. At present, a single generally applicable procedure for a complete exposure assessment does not exist. Therefore, in the near term, it is expected that integrated exposure assessments (utilizing monitoring data, results from physical and chemical models, and considerations of all routes of exposure through all media) will be conducted on a case-by-case basis.

3. The depth and accuracy of an exposure assessment should be tailored to provide the degree of knowledge required to support analytical needs. A preliminary assessment using available crude data can often shed light on the upper or lower bounds of potential risks.

4. An exposure assessment should describe the strengths, limitations and uncertainties of the available data and models and should indicate the assumptions made to derive the exposure estimates.

5. In general, an array or range of exposure values is preferable to a single numerical estimate.

5.3 Methodology of Exposure Assessment

Callahan (1987) listed three basic approaches that are used to assess exposure:

1. direct measurement: measures contact while it is happening

2. prediction: uses monitoring data, models, and population activity to estimate exposure

3. reconstruction: indications of past exposure, such as tissue levels or biomarkers, are used with other tools such as pharmacokinetics to try to reconstruct past exposure.

In this chapter, we will examine monitoring studies that include a combination of the three approaches.

Some methods for assessing exposure are specific to the source of exposure; we will concentrate in this document on methods used to assess occupational exposure and exposure by way of food.

5.3.1 Monitoring Studies

There are basically two types of monitoring studies: ambient monitoring and biological monitoring. Ambient monitoring measures the amount of a substance that is available for uptake, whereas biological monitoring measures the systemic or internal dose. In both types of monitoring studies, both direct and indirect routes must be examined. Kutz (1983) described direct pathways as those that occur through direct chemical ingestion, respiration, or dermal contact and normally occur in the workplace. He further described indirect exposure as usually occurring through ingestion of contaminated foods and beverages or contact with other contaminated environmental components.

5.3.1.1 Ambient Monitoring

Ambient monitoring can be subdivided into environmental monitoring and personal monitoring. Environmental monitoring measures the amount of a substance that is present in an area or situation and usually consists of air measurements. Personal monitoring measures the amount of the substance that comes into contact with an individual.

5.3.1.1.1. Environmental Monitoring

Environmental monitoring, or area air measurements, is perhaps the most established form of exposure monitoring; it is most commonly used for measuring pollutant levels in a given area in an industrial facility (Hushon and Clerman 1981). This form of study is more widely applicable than many occupational methods and is also used for monitoring exposure of the general populace to environmental pollutants. Environmental monitoring may be designed to collect samples for later analysis, to provide continuous readout, or to alert workers if a predetermined hazardous level of pollutant is present. This level, called a "threshold limit value" (TLV), a "permissible level," or a "recommended health-based occupational exposure limit" (World Health Organization 1984), is based on an examination of the toxicology and a determination of no-observed-effect levels (NOELs). Although limit values have been widely used and accepted in the industrial setting for many years, it is now generally believed that there are many problems with this approach. Disadvantages include the facts that (i) often only inhalation exposure is

considered, (ii) samples are not normally taken in the breathing zone of individuals, and (iii) changes in the physical activity and breathing rate of individuals are not considered.

Henschler (1984) discussed the limitations of using limit values with regard to occupational carcinogens. He pointed out that although early lists of exposure limits included proven carcinogens, contemporary approaches preclude utilization of a simplistic NOEL combined with an appropriate safety factor for cancer assessment. As a result, the scientific community has introduced the concept of a "virtually safe dose" as an exposure level that should not result in measurable excess risk. Nevertheless, the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (1987) still assigns TLVs for confirmed and suspected carcinogens. Their rationale is that where a TLV has been assigned, the existence of a biological threshold or a clear NOEL is not necessarily implied; rather, if exposures are controlled to this level (TLV), excess cancer risks would be *de minimis* and hence not likely to result in any excess morbidity or mortality.

5.3.1.1.2 Personal Monitoring

Personal monitoring, also called passive dosimetry, is normally conducted on three routes of exposure: dermal, inhalation, and oral. As discussed earlier, personal monitoring measures the amount of a substance that impinges on an individual. Durham (1981) noted that the advantage of direct entrapment methods used in these types of monitoring studies is that they provide an absolute value for a discrete exposure even within a sequence of repetitive exposures to the same chemical. They can also be used to differentiate between the relative contributions of the different exposure routes.

A. Dermal Studies

Dermal exposure is estimated by measuring the amount of a substance that is deposited on the skin of the exposed person; this value is then used to extrapolate to an absorbed dose. Deposition is measured in several ways: placing absorbent patches on the body in representative body locations and then extrapolating to the total exposed area; analyzing the clothing that a person is wearing; and using an absorbent solvent to remove the substance from the skin through hand rinses or skin swabs.

The disadvantage in measuring deposition to a small area such as that represented by a patch is the potential source of error in the extrapolation from residues on this very small area to the entire body surface area (Reinert *et al.* 1986; U.S. Environmental Protection Agency 1987b). Furthermore, crucial areas of exposure might be missed, depending on the location of the trapping devices (Franklin *et al.* 1981). An advantage of using dermal deposition methods for estimating exposure is that because deposition is thought to be dependent on physical rather than chemical parameters, estimates can be used on a generic basis for similar use scenarios. Another advantage is that it is possible to determine which region of the body receives the highest exposure and what type of operation is most likely

to lead to the high exposure. As a result, it is possible to make recommendations regarding the types of protective clothing that are appropriate for a particular use or exposure scenario.

Once deposition is measured, an estimate of the amount of chemical absorbed through the person's skin is necessary in order to estimate the absorbed dose. Absorption is normally estimated from either *in vivo* or *in vitro* dermal penetration studies. The *in vivo* studies are normally conducted on rats whose excretion of radioactivity is measured following the topical application of the labelled compound. Although this method is used frequently, there are several factors that must be considered when interpreting the data. Penetration can vary depending on the anatomic site (Maibach *et al.* 1971), the dosing concentration and timing, and the animal model chosen (Franklin 1989). *In vitro* methods involve the use of a static or flow-through cell apparatus in which the rate of absorption of the test chemical through a membrane of excised human, animal, or synthetic skin can be measured.

Although there are several advantages in utilizing *in vitro* systems, such as simplicity, speed, cost, and availability of human skin models, many uncertainties still plague the validity of this method (Franklin 1989). Although the method appears to compare well with *in vivo* approaches for hydrophilic compounds, the approach seems less reliable for hydrophobic compounds (Franklin *et al.* 1989). In addition, viability and metabolism of the skin, which play a crucial role in absorption, are often not considered. Work in this area is, however, progressing rapidly and shows great promise.

B. Inhalation Exposure

As with dermal exposure, inhalation exposure depends on deposition in the respiratory tract (especially the lungs, bronchi, or trachea) and absorption into the blood. Deposition is governed by the physical characteristics of the contaminant, whereas absorption is governed primarily by physical and chemical properties (Bennett 1986) and by the person's anatomy and pattern of respiration (Lippmann 1987). Deposition and subsequent absorption depend on the location and size of particles deposited in the respiratory tract; respirable particles are those less than about 10 μm (Bennett 1986).

Deposition can be measured by direct entrapment using several methods, including personal active samplers, denuder samplers, grab samplers, and passive diffusive samplers such as charcoal badges. A personal sampler or monitor is often preferred in occupational studies; it is placed in the breathing zone of the individual and attached to an air pump that draws air at a predetermined rate that is similar to normal human respiration. A filter of solid sorbent is placed in the monitor to capture the chemical. The choice of the filter depends on the physical and chemical nature of the substance being monitored (for a more complete description, see Bristol *et al.* 1984).

Although, as noted above, absorption should be considered, it is often assumed that 100% of a chemical collected in this manner is absorbed. One factor that has been identified as a source of exposure overestimation is resuspension of the

contaminant from the work clothing onto the personal monitor, usually placed on the lapel (Cohen *et al.* 1984). Cohen *et al.* (1984) suggested that this may be corrected by using an extension device to better simulate the position of the nose and mouth.

C. Dietary Exposure

In order to assess the potential risk associated with dietary exposure to chemical substances, it is necessary to determine the level of intake of the substance in question and to relate this to a toxicologically derived estimate of acceptable or tolerable intake.

There are two basic factors that must be considered in estimating dietary intake: (i) the level of the substance of interest in food, and (ii) the level of consumption of the food or foods that may contain this substance.

It is first necessary to identify the food or foods that may potentially contain the substance under evaluation. In the case of a ubiquitous environmental contaminant, most foods may require consideration; in contrast, a single component of the diet may be appropriate for a food additive restricted in use to, for example, vegetable oils.

a. Level of the substance in food

The level of the chemical substance in the foods of interest may be determined by monitoring the food supply. For this, knowledge of the uses that may result in the presence of the chemical substance in the food and the maximum level to be expected if the chemical substance is used according to accepted practices is important. These anticipated maximum levels are used to estimate a worst-case exposure for deliberately added substances, such as food additives or pesticides, and result in an overestimate of intake for the following reasons (Gunner and Kirkpatrick 1979; WHO 1989):

1. The product may not be used in/on all foods for which it is permitted.
2. It may not be present at the maximum level.
3. Initial levels may be reduced in the commercial processing or cooking of the commodity.

The overestimate of intake resulting from these worst-case assumptions is considered to provide a further margin of safety in the estimation of dietary intakes. More realistic estimates of the occurrence of chemical substances may be assessed by considering additional factors, including distribution of the substance within the food, the effects of processing and cooking, and data on measured levels of the substance(s) in food. Data on actual levels of such substances in foods may be obtained from multiple sources, including industry submissions, in-house research (e.g., Dabeka and Mckenzie 1987), monitoring surveys by the Health Protection Branch's Field Operations Directorate, other federal departments (e.g., Agriculture Canada 1987), provincial agencies (e.g., Frank *et*

al. 1987a, 1987b), or published reports on international surveys (e.g., the World Health Organization's GEMS program) or other surveys reported in the scientific literature (e.g., Gartrell *et al.* 1986a, 1986b; Gunderson 1988).

b. Levels of food consumption

The procedures available for the estimation of human dietary intakes of chemical substances are essentially the same as those used for the estimation of the intake of food as such or for the intake of any food component. The various approaches have been well documented and reviewed in detail in the literature (Pekkarinen 1970; Marr 1971; Bazzarre and Myers 1978; Gunner and Kirkpatrick 1979; WHO 1985).

There are two principal approaches to obtaining information on the dietary habits of a population or group of individuals. The first involves the collection of indirect data on the movement and disappearance of foodstuffs in a region; the second requires the collection of direct personal data on the actual amounts of food consumed by an individual or household.

The indirect approach makes use of national or regional food disappearance figures. An estimate of consumption per person is obtained by dividing the annual disappearance figure for a particular food by the total population (Statistics Canada 1986). Such estimates are only a first approximation, as they usually make little or no provision for wastage, seasonal variation, or distribution of food within the population on a geographic, social, or economic basis (Conacher *et al.* 1989). In this approach, atypical consumers or particular segments of the population that may warrant special consideration, such as infants, children, and pregnant women, are not considered. It is important to recognize that the derivation of intake estimates based on the assumption that a product is consumed by the entire population may result in either an underestimate or overestimate of actual intake for various segments of the population with variable eating or drinking habits.

In spite of these difficulties, this approach is generally considered to represent a valid screening procedure and a means of identifying those situations requiring more detailed investigation.

The methods employed for the assessment of food intake by individuals are significantly more complex. The design of an acceptable food monitoring survey involves consideration of a multitude of factors, including the method of data reporting (e.g., food diaries or dietary recall), duration of the study period (e.g., 24-hour recall or 7-day diary), extent of monitoring (e.g., all foods or selected commonly consumed products), and the demographics of the population (e.g., age, sex, race, socioeconomic profile, regions surveyed) (Gunner and Kirkpatrick 1979; WHO 1985). The implications of these different factors must be considered in interpreting and utilizing food intake data.

These studies provide data on representative quantities of foods consumed by individuals and may be used to derive average and upper percentile intake figures for persons in the general population subset under consideration, as well as eaters

only. The need to give consideration to upper percentile intakes is particularly significant in those instances in which the intake of a particular food is highly variable within the population as a whole or a given subset of the population (e.g., young children) (Coomes *et al.* 1982).

A survey of Canadian food consumption patterns was conducted in 1970-1972. This study provided information on average intake, distribution of intakes, and maximal intakes for a variety of population groups in different geographic locations across the country (Nutrition Canada 1976). Additional sources of food consumption estimates that are utilized for comparison include a nation-wide survey conducted by the U.S. Department of Agriculture (Pao *et al.* 1982), the Ten State Nutrition Survey (Center for Disease Control 1972), and the Health and Nutrition Examination Survey (HANES I) (Abraham *et al.* 1976). Similarly, actual survey data provided by petitioners or industry associations on specific items, reports prepared by independent analysts, or surveys reported in the scientific literature may also be consulted.

c. Estimate of exposure

The levels of chemical substances in a food are combined with the intake data in order to estimate the human dietary exposure. The levels of chemical substances in food are generally expressed as parts per million (ppm, mg/kg food) or parts per billion (ppb, µg food). The conversion of an individual concentration into a dietary intake estimate is performed by multiplying the concentration (mg chemical/kg food) by the estimated food consumption (g food/person per day). The number is then divided by 1000 to attain milligrams of chemical per person in the daily diet. These estimated exposure levels are then aggregated for all foodstuffs in which the chemical may be found and are usually expressed in terms of milligrams of chemical per kilogram body weight per day (i.e., by dividing by the body weight of a person).

Once this portion of the evaluation has been completed, consideration is given to other possible routes of exposure (e.g., air and water) in order to estimate total exposure to the chemical substance. In certain situations (e.g., ubiquitous environmental contaminants), it is necessary to consider unique routes of exposure that may contribute significantly to intake by selected subgroups of the population (e.g., in estimating lead intake in children, one needs to consider normal hand-to-mouth activity). If reliable data relating to the extent of other routes of exposure are unavailable, all relevant background information concerning the chemical substance in question is assessed to determine the likelihood of exposure from other sources. If that likelihood exists, the feasibility of estimating such exposure is studied.

Once the total probable daily intake of the chemical substance from all food sources is determined for various age groups, different sexes, and various segments of the population, it is compared with a toxicologically derived estimate of acceptable or tolerable intake to assess whether exposure to the substance from the food supply poses a health hazard.

In summary, the estimate of human dietary exposure to chemicals is based on analytical data on the occurrence of the substance in foods and on intake data. At present, a single generally applicable procedure for the assessment of dietary exposure does not exist (Health and Welfare Canada 1989). Each evaluation represents a unique set of circumstances requiring consideration of different factors at each stage of the assessment related to the integrity of the data base. The overall estimate actually involves numerous assessments of dietary exposure based on mean and upper percentile food consumption data from various age groups and different sexes in a given population. In this way, an array of exposure estimates for both average and worst-case scenarios can be considered, and segments of the population at greatest risk can be identified.

5.3.1.2 Biological Monitoring

Biological monitoring involves the measurement of a chemical or its metabolites in human biological tissue, such as blood, urine, feces, hair, breath, sweat, and fat. The major advantage of biological monitoring over ambient monitoring is that it reflects exposure via all routes and from all sources. However, in order to interpret biological monitoring data, a thorough understanding of the pharmacokinetics of the substance is necessary.

Many authors have identified the importance of a knowledge of the pharmacokinetics of a compound when utilizing biological monitoring to determine exposure to the substance (Aitio 1984; Vainio 1985; Aitio and Jarvisalo 1985; Bernard and Lauwerys 1986, 1987; Severn 1987; Franklin 1989; Ritter and Franklin 1989). It is essential to know how a substance is absorbed, subsequently distributed to different compartments of the body, biotransformed, and, finally, eliminated, as well as whether it accumulates in the body (Bernard and Lauwerys 1987). Such data are essential to the determination of the most appropriate biological tissue to be sampled, as well as the proper sampling period.

There are many difficulties in conducting biological monitoring studies, as well as in interpreting the data. Aitio (1984) suggested that sources of error in biological monitoring studies may include levels of measured chemicals that do not remain stable, physiological variation, pharmacokinetic effects (e.g., half-life), contamination of specimens during collection and handling, gross laboratory mistakes, and analytical variation. Compliance by study subjects can also be a problem.

The two major approaches to biological monitoring are discussed below.

5.3.1.2.1 Determination of a Chemical or its Metabolites in Biological Fluids

The most common biological materials that are monitored are urine, blood, and respired air, although sweat, fat, feces, saliva, mother's milk, and hair can also be used. The majority of tests are selective for a specific chemical or metabolite, although some are non-selective and specific only to a group of chemicals (Bernard and Lauwerys 1986).

A. Urine Monitoring

Urine and feces, and, in some cases, respired air, represent the primary routes of chemical excretion. The collection of urine to determine the systemic dose of a chemical is the most convenient and practical method of biological monitoring, because it is non-invasive and relatively easy. However, in order to measure the dose resulting from a single exposure, it is necessary to collect full 24-hour urine samples, and compliance by the study subjects is sometimes difficult. When measuring long-term occupational exposure, random sampling will estimate an integrated sum of cumulative exposures over several preceding days (Coye *et al.* 1986). However, as noted above, knowledge of the kinetics is essential to the proper interpretation of these data. An advantage of urine monitoring for workers in an occupational setting is that the level of a metabolite in the urine is much less influenced by a very recent exposure than is the concentration of unchanged chemical in the blood or alveolar air (Bernard and Lauwerys 1986, 1987).

B. Blood Monitoring

Monitoring blood as a measure of exposure is common when urine tests are not applicable; it may be utilized when exposure is too low for detectable levels of urinary metabolites to be produced, the substance is poorly transformed, or the urinary metabolite has a very low specificity (Bernard and Lauwerys 1987). Bernard and Lauwerys (1987) pointed out that the determination of unchanged chemical in blood usually is more specific than the determination of a metabolite, which may be common to several substances. The major disadvantage of using blood as a measure of exposure is that it is an invasive method; therefore, it is more difficult to achieve participant compliance. Aitio (1984) also noted that if most exposure occurs via the skin, the site of blood collection may influence the levels of the substance; as well, meals can influence chemical levels in blood, because the blood lipid concentration is increased after a meal and, consequently, so too is the dissolution capacity of the blood.

C. Breath Monitoring

Monitoring of respired air is not as common as urine or blood monitoring. Droz and Guillemin (1986) identified the reason for the limited use of breath monitoring as a lack of methodology and adequate background data. Methods have, however, been developed for measuring exposure to volatile pollutants, such as benzene, toluene, and xylene (Pellizzari *et al.* 1988). The advantages of breath monitoring are that it is non-invasive, it can be used for a large number of compounds, and it involves a simpler analysis than blood or urine monitoring because of a simpler matrix (Droz and Guillemin 1986).

5.3.1.2.2 Measuring Non-adverse Biological Effects

Utilization of this method of exposure analysis is possible only if the chemical's mechanism of action is well understood; hence, use of this method remains limited. Where applicable, monitoring of this type offers the possibility to estimate indirectly the amount of chemical reacting with the target sites (Bernard

and Lauwerys 1987). Examples of these tests include inhibition of pseudocholinesterase activity, urinary excretion of D-glucaric acid, measurement of metallothionein in urine, and the alkylation of amino acids in circulating proteins. Neumann (1984) examined the analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents and found that all genotoxic agents studied so far have been shown to react with hemoglobin *in vivo*; he suggested that the method warrants wide applicability. He further noted that hemoglobin adduct levels are directly proportional to absorbed dose over a wide range of doses, although they are affected by numerous characteristics of the individual, such as pharmacokinetics.

5.3.2 *Modelling Studies*

Relatively little modelling has been conducted for exposure in the occupational setting, from indoor air, or through the use of consumer products. Most models have been developed to measure outdoor air levels of non-reactive pollutants. In most models, chemical release, transport, and fate are used to predict the exposure of individuals as a function of use patterns. Some models can be extremely complex and difficult to validate, and it is important to conduct sampling to support the model.

5.4 Some Important Issues Affecting Interpretation of Exposure Estimates

Exposure assessment is a very new and inexact multidisciplinary science that can include toxicology, pharmacology, pharmacokinetics, medicine, biochemistry, environmental engineering, and environmental science. The Acting Assistant Administrator of the U.S. Environmental Protection Agency has called exposure assessment the weakest link in the risk assessment process (Bretthauer 1989). Although the estimation of human exposure in the occupational setting is more highly developed than for most other situations, there are still many limitations to utilization of the data collected. Several important issues complicate the interpretation of exposure data and are discussed in greater detail below.

5.4.1 *Time-dependent Exposures*

Estimates of human cancer risk are frequently based on experimental animal data obtained over different exposure periods and frequently different exposure routes; these may be quite different from the duration or route of exposure anticipated in humans. For example, occupational exposure to pesticides frequently occurs at relatively high levels, but only for several days per year; in contrast, animal data normally reflect daily lifetime dietary exposure. Contemporary risk models assume that the relatively high daily dose estimate based on a short-term exposure study will occur every day (non-amortized exposure) or, alternatively, that the

total dose measured over a short period is averaged over a lifetime (amortized exposure). Neither of these approaches accurately reflects typical occupational exposure to pesticides.

Most mathematical models utilized to predict carcinogenic risk assume that exposure is chronic and constant (Murdoch and Krewski 1988). Frequently this is not the case; exposure can change daily or seasonally and may also be dependent on variable factors. Krewski and Murdoch (1988) noted that although some models allow for variable dosing regimes, many use a simple time-weighted average dose. They further showed that risk predicted on the basis of a simple time-weighted average level of exposure will differ from actual risk corresponding to the particular time-dependent exposure pattern experienced.

The case of methylene chloride can be used to illustrate the impact of the time course of exposure on the overall risk assessment. There are two major pathways for the metabolism of methylene chloride. One of these, the mixed function oxidase (MFO) pathway, is localized in the smooth endoplasmic reticulum of cells, is saturable at relatively low doses (500 ppm by the inhalation route in rats and mice) (U.S. Food and Drug Administration 1989), and has a high affinity but a low capacity for the metabolism of methylene chloride (Elder 1988). Higher doses of methylene chloride do not increase the metabolism by this pathway. The alternate route, the glutathione transferase pathway (GST), is found in the soluble fraction of the cytoplasm. This pathway is not saturable at high doses of methylene chloride and has a low affinity and high capacity (Elder 1988); consequently, higher doses of methylene chloride result in increased metabolism by this pathway.

Many scientists have argued that the intermediates generated by the GST pathway are responsible for causing cancer in the mouse, and that neither methylene chloride *per se* nor the intermediates of the MFO pathway contribute to carcinogenesis. If such arguments are valid and applicable to humans, it suggests that a low level of chronic exposure would not lead to human cancer, as the MFO pathway would not be saturated. If, however, individuals were exposed to very high levels of methylene chloride, even for a short time, as might be expected in the occupational setting, the MFO pathway could be saturated, causing the GST pathway to be utilized, thus possibly leading to a carcinogenic end point. In this case, if the high exposure found in the occupational setting had been averaged over a lifetime, resulting in a lower estimate of daily exposure, the risk would be underestimated. This exemplifies the importance of a sound understanding of the expected duration and frequency of exposure, as well as the metabolism of the substance of concern.

5.4.2 Extrapolation to Large Populations

Most occupational exposure studies utilize small sample sizes, and it is necessary to extrapolate to a large and variable target exposed population. However, occupational groups are better defined than the general population; hence, the limitations of the extrapolation are better understood than in an assessment of

exposure for the general population. Exposure studies of indoor pollutants have shown that extrapolating from one home to another is very difficult because of the variability of parameters in the home that can influence exposure. When studies conducted in one area of the country are extrapolated to another area, the problem becomes even more complex.

5.4.3 High-risk Populations

Two population subsets often not considered in exposure and risk assessments are those that demonstrate excessive susceptibility to a particular compound and those more highly exposed because of different exposure parameters. The first is a growing group of individuals very sensitive to environmental contaminants, and these people may be at a higher risk than the general population. The second group, which includes children and industrial workers, may be more highly exposed as a result of differences in lifestyles; higher exposure for this group may result from the environment, workplace, eating habits, and recreational activities. A risk assessment based on the "typical" person would not accommodate these two groups.

5.4.4 Quality Assurance

Quality assurance is an essential component of any scientific assessment. Although no less important in exposure studies, it is particularly difficult to ensure in exposure studies because they are rarely conducted in controlled laboratory settings. Furthermore, compounds of concern are often present at very low levels, leading to the potential for a high degree of error due to analytical difficulties.

5.4.5 Summary – Overall Limitations of Exposure Estimation

An exposure assessment is dependent upon many parameters and assumptions that must be defined as completely as possible. Exposure estimations rarely consider all possible routes of exposure, particularly those that are difficult to monitor. For example, while both the dermal and inhalation routes may be monitored in an occupational setting, the contribution that oral exposure may make through contaminated food or cigarettes is seldom considered in occupational exposure studies, thus potentially underestimating the true level of exposure. Also, during the monitoring of environmental pollutants, only the inhalation route is normally considered. Further, once the data, albeit limited, on the amount of chemical deposited are available, an assumption regarding the amount absorbed dermally, by the inhalation route, or orally is necessary.

The use of biological monitoring, which captures exposure by all routes and estimates an internal dose, is the best solution to these problems. Unfortunately, there is rarely an adequate understanding of the pharmacokinetics of the

substance to allow interpretation of biological monitoring data. Furthermore, the health effects data utilized in risk assessment are normally based on animal studies in which only one route of exposure was studied.

For an exposure assessment, the population being considered must be determined – whether exposure in the "typical" scenario or the "worst-case" scenario is being estimated. For either, a large number of assumptions are made with regard to body weight, lifespan, lifestyle, and contact rate (e.g., the number of hours a child may play on a carpet treated with a potentially carcinogenic compound). For exposure assessments based on modelling, assumptions are made with respect to exposure pathways, transformation, fate, and populations at risk. Davis and Gusman (1982) noted that is not helpful to think in terms of the "average" individual; rather, difficult topics such as ranges of individual exposures and susceptibility must be dealt with. They suggested that the scientist and regulator alike must accept, however grudgingly, the inexact and usually hypothetical nature of the field.

For most exposure assessments, only a single substance is monitored and considered. In reality, it is rare for exposure to be limited to one environmental contaminant. Examining a substance in isolation from its total environment is bound to lead to a narrow and probably erroneous estimation of hazard and, consequently, of risk. This problem is not, however, limited to exposure assessment, as it is equally rare to examine the toxicological effects resulting from exposure to more than one substance at a time.

6. Interpretation and Evaluation of Carcinogenesis Data

The text has so far concentrated on three factors of importance to the identification and control of chemical carcinogens:

1. epidemiology, which gives direct evidence as to whether or not an agent is associated with cancer in humans;

2. a brief consideration of the carcinogenesis bioassay, usually in rodents, which gives direct evidence that the test material is, or is not, carcinogenic in one or more surrogate species, and the potential for the agent being carcinogenic in humans; and

3. the likely or actual level of human exposure if the agent is an environmental chemical.

The remainder of the text considers what assumptions are required to use this information for the regulation of potential human carcinogens in the environment and whether there is adequate justification for these assumptions from regulatory and scientific viewpoints.

It has been in the past, and in many cases still is, customary to assume that an agent demonstrated to be a carcinogen in one or more surrogate animal species is potentially carcinogenic to humans. This prudent assumption has to be questioned in view of Haseman and Huff's (1987) review of the 266 chemicals tested in both rats and mice in the U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program (NCI/NTP) Bioassay Program, which showed that the two phylogenetically similar (i.e., genetically related) rodent species predicted that a chemical would be carcinogenic in the other species in only 74% of the total number of examples considered. This analysis raises serious questions as to whether the comparison of these rodent species with the phylogenetically separate human species necessarily gives an adequate indication of the likely human carcinogenicity of identified rat and mouse carcinogens. Some assurance of the correctness of such an assumption is given by the demonstration (Vainio *et al.* 1985) that nearly all agents shown by epidemiological methods to give "sufficient" or "limited" evidence of carcinogenicity in humans are also carcinogenic in surrogate species. There is no evidence to indicate that animal carcinogens are likewise nearly always carcinogenic in humans.

There are two major groups of problems to be addressed in comparing the carcinogenic effects of animal carcinogens with those to be expected in the human population. The first group of problems concerns the way in which test species and the test agent interact. The second set of problems concerns the fact that humans are usually exposed to much lower levels of the test agent than are

experimental animals treated with the Maximum Tolerated Dose (MTD) and fractions thereof (see Section 4.2.4). This set of problems encompasses the need for extrapolation from high to low doses.

The classical approach to the first group of problems, unless data are available to the contrary, is to assume that the human response to an agent will be of the same order of magnitude as the response of the most sensitive experimental species. The data obtained in that species are used to calculate, again making assumptions, the possible human response to the actual or perceived exposures to the animal carcinogen under consideration. There is, however, an ever-growing number of animal carcinogens being identified as a result of cancer bioassays; as a result, there is a growing need to improve the way in which their effects are assessed for regulatory purposes.

6.1 The Classical Approach to the Assessment of Hazard to Humans from Animal Carcinogens

6.1.1 General Considerations

The classical approach to the identification and classification of human carcinogens from animal bioassay data has been summarized by the International Agency for Research on Cancer and is used in their "IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans" (IARC 1972-1987). These monographs provide an excellent, in-depth, scientific review of each bioassay that has been performed with the title chemical. There is an account of the physical and chemical properties of the agent; its production, occurrence, and use; epidemiology (if any); and other relevant biological data, including genotoxicity, metabolism, and some toxicity. The evaluations were, however, formerly based only on the carcinogenicity data, despite the fact that other data are recorded. The International Agency for Research on Cancer is now starting to take mechanistic considerations into account.

6.1.2 Considerations of Dose, Pharmacokinetics, and Metabolism of DNA-interactive Carcinogens and the Shape of the Dose-Response Curve

Knowledge of the shape of the dose-response curve is a major asset in the interpretation and regulation of toxic phenomena. Such dose-response curves are especially valuable if the level and identity of the chemical dose actually delivered to the target site, rather than the overall level of exposure of the test animal, are used. With carcinogenesis, as with many other toxic processes, the shape of the lower ranges of the dose-response curve is for practical purposes unattainable, because the use of an adequate number of animals needed for the low-dose part of the curve is so demandingly large as to be outside the capability of even the most wealthy nations. Furthermore, it is doubtful whether the

carcinogen dose-response curve obtained for one chemical will necessarily be applicable to any other relatively closely related chemicals, as the mechanisms of carcinogenesis are so complex that even slightly different agents may exhibit major differences in the dose-response curve.

For this reason, a conservative practice is to assume that the lower part of the dose-response curve is linear. This assumption is not based on experimental data; for example, the "mega" mouse experiment, which used over 23 000 mice to determine the shape of the dose-response curve for the known experimental carcinogen, N-2-acetylaminofluorene, to a level of tumour induction of 1%, exhibited two distinct shapes of curve. This experiment showed that the shape of the dose-response curve for the liver tumours was near linear, whereas that for the urinary bladder tumours demonstrated exceedingly low tumour incidences at the lower doses followed by a steep rise (Staffa and Mehlman 1979). Statistical analyses of these data have failed to resolve the shape of the dose-response curve below the 1% excess risk point. Brown and Hoel (1983) showed that the apparently linear dose-response relationship for liver tumours is not inconsistent with a threshold at low doses; Gaylor *et al.* (1985) argued that a shallow linear trend below the apparent threshold for bladder tumour induction could not be ruled out.

The practical limitations on the determination of the lower part of the dose-response curve are compounded by the fact that carcinogenesis is a stochastic event. In other words, carcinogenesis affects certain individuals in a population while leaving others apparently free from the disease. This, combined with the different sensitivities of the individuals in each population, makes it mathematically impossible to demonstrate a threshold or no-effect level and greatly increases the degree of uncertainty about the level of risk posed by exposure to low doses of carcinogens. Consequently, some agencies either choose or are legally mandated to assume that there is no acceptable level of exposure to any carcinogen or to use mathematically based extrapolation techniques for which there is limited biological justification. A number of avenues of research are being opened up to resolve this problem.

The reason why physiological pharmacokinetic studies may not always be particularly helpful in determining the shape of the dose-response curve is that many administered carcinogens do not interact directly with the critical tissue target. They require activation by one or more of those enzyme systems that are normally responsible for the detoxification and clearance of test agents. Because of the instability of these active derivatives, they cannot be extracted from the tissues and adequately analyzed, particularly when they are present at very low levels. Moreover, with some carcinogens, such as N-2-acetylaminofluorene, it has been shown that there is more than one active product, even within the same strain and species of test animal. At one time, it was believed that the ability to detoxify and clear foreign chemicals was confined mainly to the liver. It has subsequently been shown that different tissues within a species each have some

ability to metabolize foreign chemicals. In some cases, such as the lining of the urinary bladder, the ability to activate carcinogens is as high, on a cell-to-cell basis, as in the liver.

It is reasonable to be convinced (see Section 6.2) that, for genotoxic carcinogens, the active products discussed earlier interact with cellular DNA to form DNA adducts that are important in the induction of cancer. There is much sound information showing that DNA adducts are formed with many different types of carcinogen, including some polycyclic aromatic hydrocarbons, some aromatic amines, some N-nitroso compounds, and some aflatoxins. Currently available technology makes it possible to analyze quantitatively the different types of chemical adducts found in DNA and has demonstrated that some adducts may be more important in the carcinogenic process than others. Moreover, molecular biological techniques, such as DNA post-labelling (a method to attach a highly radioactive marker to specific fragments of the DNA), may make it possible to quantitate low levels of adduct formation or other induced DNA damage caused by very low levels of activated metabolites. This approach should offer the eventual possibility of refining low-level dose-response investigations (Hoel *et al.* 1983; Lutz 1990).

Overall, therefore, it is clear that many problems remain to be solved before it is possible to determine accurately the shape of the carcinogen dose-response curve. For this reason, it is necessary to make assumptions about the shape of the curve in evaluating the likely human response to low levels of environmental carcinogens that have the capability to interact with cellular DNA.

6.1.3 Quantitative Factors in Carcinogenesis Risk Assessment

6.1.3.1 Mathematical Models of Carcinogenesis

The quantitative description of neoplastic processes requires a mathematical model of carcinogenesis. The multistage model has a long history of use in theoretical descriptions of carcinogenesis (Whittemore and Keller 1978; Brown and Koziol 1983; Armitage 1985). As described by Armitage and Doll (1961), a stem cell must sustain a series of mutations in order to give rise to a malignant cancer cell. This model predicts that the age-specific cancer incidence rates should increase in proportion to age raised to a power related to the number of stages in the model, and it provides a good description of many forms of human cancer by allowing for between two and six stages.

Moolgavkar *et al.* (1986a, 1986b) and Moolgavkar and Luebeck (1990) discussed a biologically motivated model of carcinogenesis based on the hypothesis that a tumour may be initiated following the occurrence of genetic damage in one or more cells in the target tissue as a result of exposure to an initiator. Such initiated cells may then undergo malignant transformation to give rise to a cancerous lesion. The frequency of such lesions may be increased by subsequent exposure to a promoter, which serves to increase the pool of initiated cells through mechanisms that result in clonal expansion.

Mathematical formulations of this process have been given by Moolgavkar *et al.* (1988) and Greenfield *et al.* (1984). This stochastic birth-death-mutation model assumes that two mutations, each occurring at the time of cell division, are necessary for a normal cell to become malignant. Initiating activity may be quantified in terms of the rate of occurrence of the first mutation. The rate of occurrence of the second mutation describes progression to a fully differentiated cancerous lesion. Promotional activity is measured by the difference in the birth and death rates of initiated cells. In the absence of promotional effects and variability in the pool of normal cells, the two-stage birth-death-mutation model reduces to the classical two-stage model.

The birth-death-mutation model provides a convenient context within which to quantitatively describe initiation/promotion mechanisms of carcinogenesis (Thorslund *et al.* 1987). An initiator is a substance that increases the rate of occurrence of the first mutation, whereas a promoter increases the pool of initiated cells. The term "progressor" has been used to describe an agent that increases the rate of occurrence of the second mutation resulting in malignant transformation to a cancerous cell (U.S. Environmental Protection Agency 1987a). It is possible that the same agent may increase the rate of occurrence of both mutations, thereby enhancing both initiation and progression.

The two-stage model has recently been applied by Thorslund and Charnley (1988) in the estimation of cancer risks associated with exposure to dioxin and chlordane, two putative tumour-promoting agents. This model provided a good fit to laboratory bioassay data on these two compounds, thereby facilitating a quantitative description of the mechanism of carcinogenic action within the framework of the two-stage model. Using either a simple exponential (one-hit) or logistic model to describe the dose-response relationship for promotion, this analysis led to estimates of risk that were appreciably lower than those based on the linearized multistage model. Before this model can be recommended for routine application, however, its statistical properties require further study, particularly with respect to predictions of risk at low doses (Portier 1987).

6.1.3.2 Carcinogenic Potency

A number of numerical indices have been proposed to describe the potency of chemical carcinogens (Barr 1985). Gold *et al.* (1984) tabulated the TD_{50} for a large number of chemical carcinogens using the results of laboratory studies of carcinogenicity, thereby popularizing this particular index. Formally, the TD_{50} is defined as the dose that reduces the proportion of tumour-free animals by 50% (Peto *et al.* 1984; Sawyer *et al.* 1984). The TD_{50} for chemical carcinogens can vary by more than six orders of magnitude, indicating large differences in carcinogenic potency (Krewski *et al.* 1990a).

Some correlation has been noted between the TD_{50} and the LD_{50} used to measure acute toxicity (Zeise *et al.* 1984, 1986), although the degree of correlation is limited (Metzger *et al.* 1989). The TD_{50} is also correlated with the Maximum Tolerated Dose (MTD), generally used as the high dose in carcinogen bioassay (Bernstein *et al.* 1985). Little correlation between the TD_{50} and biological indicators of tumour pathology is apparent (Gold *et al.* 1986), indicating the impossibility of summarizing the characteristics of a chemical carcinogen in a single index (Wartenberg and Gallo 1990).

Correlations between the TD_{50}, LD_{50}, and MTD need to be interpreted with care (Crouch *et al.* 1987). As the range of possible values of the TD_{50} is limited by the choice of the MTD, the wide variation in the carcinogenic potency of different chemicals necessarily induces a correlation between these two indices (Bernstein *et al.* 1985). In this regard, Rieth and Starr (1989) noted that little correlation exists between the TD_{50} and MTD after normalizing the TD_{50} values relative to the MTD. Rieth and Starr (1989) also suggested that the correlation between the LD_{50} and the TD_{50} may arise because the TD_{50} is often a large fraction of the LD_{50}.

6.1.3.3 Low-dose Risk Assessment

Although the TD_{50} may be of some use in representing the overall strength of carcinogenic substances, it does not necessarily provide an indication of the level of risk posed at low exposure levels (Wartenberg and Gallo 1990). Low-dose risk assessment is generally done by extrapolating results obtained at higher doses approaching the TD_{50}. Although the choice of the dose-response model to be used for extrapolation purposes can have a marked impact on estimates of low-dose risk (Krewski and Van Ryzin 1981), such differences are small when attention is restricted to models that are linear in the low-dose region. The assumption of low-dose linearity for chemical carcinogens that act through direct interaction with genetic material is supported by both theoretical considerations in carcinogenesis (Krewski *et al.* 1991) and the linearity of DNA binding observed at very low doses with a number of chemical carcinogens (Lutz 1990). Although not applicable in cases in which carcinogenesis occurs subsequent to toxic tissue injury, the assumption of low-dose linearity is widely made in regulatory applications of low-dose risk assessment in the absence of clear information to the contrary (Office of Science and Technology Policy 1985).

The U.S. Environmental Protection Agency (1986) uses the linearized multistage model to obtain estimates of low-dose risk. This is done by obtaining an upper confidence limit q_1^* on the linear term in the model (Crump 1984). The value of q_1^* represents the slope of the dose-response curve in the low-dose region and is equal to the risk associated with a unit measure of dose (such as 1 mg/kg per day). Only an upper confidence limit on the low-dose slope is used by the U.S. Environmental Protection Agency, on the grounds that the maximum likelihood estimate of this parameter is highly unstable. The value of q_1^* derived from the

multistage model is negatively correlated with the TD_{50} (Krewski *et al.* 1989). Thus, potent compounds with a low TD_{50} will tend to be associated with higher levels of risk at low doses than will compounds with high TD_{50}s.

Because the multistage model does not provide for tissue growth and cell kinetics, which are recognized as potentially important determinants of carcinogenesis in the two-stage birth-death-mutation model, it may provide an incomplete description of carcinogenesis is some cases. It is unlikely, moreover, that any simple mathematical model can provide a universally satisfactory basis for describing all possible mechanisms of neoplastic development. For this reason, Krewski *et al.* (1990b) proposed a model-free extrapolation approach to low-dose cancer risk estimation, which assumes only that the dose-response curve is linear at low doses. The estimates of low-dose slopes based on the model-free extrapolation approach are generally close to those based on the linearized multistage model.

6.1.3.4 Pharmacokinetics

Many chemical carcinogens require some form of metabolic activation in order to exert their effects. In this event, pharmacokinetic models may be used to describe the uptake, absorption, distribution, and elimination of xenobiotics (O'Flaherty 1981). This, in turn, may permit estimation of the amount of the reactive metabolite reaching the target tissue. Tissue dosimetry is important for risk assessment purposes in cases in which one or more steps in the process of metabolic activation are saturable, as this can lead to a non-linear relationship between the dose of the parent compound administered to the test subjects and the dose of the reactive metabolite reaching the target tissue (Hoel *et al.* 1983).

In the past, compartmental pharmacokinetic models have been widely used to describe biological systems in terms of a small number of conceptual compartments (Godfrey 1983). More recently, physiological pharmacokinetic models in which the body is represented by a larger number of physiologically meaningful compartments have been used to describe the process of metabolic activation (Menzel 1987; Reitz 1990). The application of physiological pharmacokinetic models in practice requires extensive information on the anatomy and physiology of the test animals, the solubility of the test chemical in various organs and tissues, and biochemical parameters governing metabolism (Andersen *et al.* 1987).

If metabolic activation can be adequately characterized in terms of a suitable pharmacokinetic model, the dose delivered to the target tissue may be used in place of the administered dose for purposes of dose-response modelling. Although this may be expected to lead to more accurate predictions of carcinogenic risk (Krewski *et al.* 1987), this may not always be the case when the uncertainty associated with the many parameters involved in a physiological pharmacokinetic model is taken into account (Portier and Kaplan 1989).

6.1.3.5 *Species Conversion*

Ideally, quantitative interspecies extrapolation of carcinogenic risks should take into account known species differences. Traditionally, dose equivalency among species has been based on body weight. However, many physiological constants (e.g., consumption of water, food, and oxygen) have been shown to vary as a power function of body weight (Linstedt 1987). Dourson and Stara (1983) pointed out that there is evidence to suggest that the metabolic rate and toxicity of many compounds may be more accurately related to body surface area than to body weight (Pinkel 1958; Freireich *et al.* 1966). The activity of drugs in human infants and newborns has also been related to body surface area (Wagner 1971; Homan 1972).

The use of a general power function of body weight for species conversion includes body weight conversion as a special case with a power of unity (Krewski *et al.* 1990b). Because body surface area varies approximately in proportion to the 2/3 power of body weight, surface area conversion represents another special case of the general power law relation. Specifically, this implies that if toxicity in different species is proportional to surface area rather than to body weight, then the dose per unit body weight that produces a given effect will decrease with the 1/3 power of body weight. Based on a reanalysis of the data used by Freireich *et al.* (1966), Travis and White (1988) suggested that body weight to the 3/4 rather than the 2/3 power may be more appropriate for species conversion.

6.2 Carcinogenesis Mechanisms

The concept that the process of chemical carcinogenesis may be separated into two or more broad phases has been mentioned previously (see Sections 1.3 and 4.2.9.2). The concepts of initiation and promotion have been demonstrated to be applicable to the induction of cancer in several tissues, including the mouse skin, with which most of the original work was done. Mechanistically, much more is known about how initiation works than about promotion.

6.2.1 *The Mechanism of Genotoxic Carcinogenicity*

The process of cancer initiation involves converting the apparently normal cells of a tissue to cells that will, under appropriate circumstances, develop into tumour cells and frank cancer. There is increasing evidence that this change is brought about by a chemically induced mutation or other genotoxic action of the initiating chemical. The possibility that initiation includes an alteration in the genetic information in the target cell is strongly supported by the demonstration that many specific carcinogenic chemicals either chemically interact with or otherwise damage the DNA (Swenberg *et al.* 1990), which encodes the genetic information controlling the cell. The relevance of DNA interaction is supported by the discovery that the genetic defect carried by some patients with the disease xeroderma pigmentosum makes these patients unable to repair their skin DNA

from the effects of sunlight and other ultraviolet irradiation. As a result, their skin, in contrast to that of unaffected people, develops a much higher incidence of various lesions, ranging from erythema to multiple skin cancers.

The fact that *in vitro* genotoxicity tests for chemical mutagens predicted moderately well for carcinogens of some chemical classes similarly supports a correlation between initiation and genotoxicity. The recent discovery that many tumours, in both humans and animals, contain common genes that arise by activation of specific genes in the normal cell's genome has greatly strengthened the concept that cancer initiation involves a genetic event. The tumour-specific genes are known as oncogenes (or suppressor genes) (Klein and Klein 1984; Barbacid 1986; Ramel 1986; Klein 1987) and appear to be derived from similar, but not completely identical, DNA sequences in the normal tissues that have come to be known as proto-oncogenes. The genetic events involved in proto-oncogene activation include the mutation of a single base in the DNA sequence (point mutation), transposition of the proto-oncogene to a more favoured site in the genome, and the deletion of part of the DNA sequence.

Evidence that a chemical attack on a cell's DNA is not, as was previously thought, completely random is beginning to emerge. It now appears that the initiating agent attacks not only a specific base or bases in the DNA (e.g., guanine) but also specific bases dependent on their position in a definable sequence of bases (Dolan *et al.* 1988). The significance of this novel finding and the specificity that appears to be associated with proto-oncogene activation have yet to be explored in terms of their influence on the tissue and species specificity of individual carcinogens. The finding promises some major advances in the understanding of why some species and some tissues show unexpectedly high or low responsiveness to individual carcinogens.

At a practical level, the process of initiation may be regarded as a composite of three successive competitions. The first competition is between the processes that activate the carcinogen and those that detoxify either the carcinogen or its activated products. Some carcinogens, known collectively as biological alkylating and arylating agents, are chemically capable of spontaneous conversion to active intermediates. The competition in this case involves the rate of formation of the active intermediate, on the one hand, and the rate of inactivation of the carcinogen and its active product, on the other. The majority of carcinogens require metabolic activation to be transformed to an active intermediate, and the competition is thus between the rate of enzymatic production of the intermediate and the enzymatic detoxification of the intermediate or of the administered chemical. There are numerous experiments that clearly demonstrate that the modification of metabolic enzyme levels – for example, by agents that "induce" higher levels of some but not all of these enzymes – has a profound effect on the number of tumours induced by a particular level of a carcinogen (Wattenberg 1978).

The reactive intermediate, produced in the first competition, may react with many biological entities in the tissue, including protein, ribonucleic acid, polysaccharides, and simpler molecules, such as water, glutathione, and so on.

The second competition is thus between the presumed critical targets in the DNA and alternative targets for the active intermediates. The probability that the active intermediate will interact with critical sites on the DNA depends on (i) the concentrations of alternative targets, (ii) the medium through which the active entity has to travel to reach the critical target, (iii) the presence of biological barriers, such as the placenta, and (iv) the active entity's innate reactivity, which determines the ease of reaction with alternative targets as well as with the critical region on the DNA.

There are several critical experiments that demonstrate that markedly increasing the level of alternate targets in the tissues may sometimes reduce the capacity of an agent to induce cancer. The importance of the distance the agent has to travel is demonstrated by the inability of rodent fetal tissues to metabolically activate a number of carcinogens (Juchau and Harris 1990) and the consequent failure of the fetal tissue to develop tumours as a result of *in utero* exposure to a carcinogen, because the activated intermediate is too unstable to travel from the maternal tissues through the placenta to the fetal tissues (Clayson 1982). Many different active intermediates have been suggested to be formed in the course of chemical reactions. Most of these postulated intermediates are too reactive to escape from the site of the chemical reaction and are thus irrelevant to *in vivo* carcinogenesis (Clayson 1987).

The chemical complexes formed between the DNA and the activated carcinogens are not of themselves genetic lesions. Their conversion to genetic lesions, which is called "fixation", is dependent on a further competition. There are systems present in most human and animal cells that are capable of repairing damaged DNA, and these restore the DNA faithfully to its normal state. DNA repair systems are in competition with the processes of DNA replication that are "error prone", if there are lesions or adducts present in the DNA replication. These errors lead to the true genetic lesions.

6.2.2 Mechanistic Aspects of Cancer Promotion or Development

There is much less understanding of the way in which the initiated cells, discussed in the preceding section, may develop into cancer. The following comments concentrate on the consequences of a single approach to this complex area. This approach appears to accommodate the available facts. It is not meant, however, to imply that addition of new scientific knowledge will necessarily leave these ideas intact.

Tumour development in initiated mouse skin has been shown to be divisible into two phases, called "conversion" and "promotion" (Kinzel *et al.* 1986). This advance has been achieved by painting two chemicals sequentially onto initiated mouse skin and demonstrating that, whereas neither chemical treatment alone markedly enhanced tumour development, the combination was most effective. In mouse skin, the conversion treatment is effective even if applied several weeks

before the initiating agent, but the reason for this is not known. Similar studies in other tissues await the identification of suitable pairs of chemicals capable of inducing conversion and promotion, respectively.

From the biological viewpoint, initiated cells are likely to be restrained from cell division leading to tumour formation by cell-to-cell cooperation (Yotti *et al.* 1979). Cell-to-cell cooperation is established to permit cells to exchange essential nutrients or other molecules if and as the need arises. Failure (or absence) of the restraints on cell division due to cell-to-cell cooperation may occur for several reasons and will thus permit cell division. The initiated cells may, for example, be sufficiently aggressive to override the inhibitory effects of cell-to-cell cooperation, and thus frank cancer will arise without intervention. Alternatively, continuous carcinogen treatment may induce cell death and subsequent regeneration, thus favouring division and growth of the initiated cells. The normal level of cell replacement and growth of the tissue may permit the initiated cells to develop. Finally, the use of a cancer promoting agent may accelerate initiated cell division and tumour development (e.g., Kinzel *et al.* 1986).

The major thrust of this analysis of what is required for tumour development leads to the concept that more than one mechanism of tumour development or promotion is involved. Thus, it will most probably be necessary, in deciding how cancer promoting agents are effective, to consider a range of different mechanisms on a chemical-by-chemical or tissue-by-tissue basis to decide which is appropriate in a particular instance.

6.2.3 Genotoxic and Non-genotoxic Carcinogens

The present operational definition of the term carcinogen as an agent that increases the number of malignant tumours in a population (see Section 1.3) raises the possibility that many agents that do not have the ability to induce each of the mechanistic stages of carcinogenesis identified in the previous sections may be identified as potential human carcinogens or as animal carcinogens. For example, if, as seems likely, the human and animal populations are exposed in their diets to naturally occurring carcinogens that have the potential to initiate carcinogenesis, it is possible to visualize agents leading to (i) increased levels of active metabolites through the alteration of the level of metabolizing enzymes, or (ii) decreased tissue levels of alternative targets for the active metabolite, or (iii) reduced DNA repair capacity, or (iv) enhanced cellular proliferation in the affected tissues as being capable of enhancing the induction of tumours from the initiated cells and, in consequence, as being complete (initiating and promoting) carcinogens. Further, exposure to naturally occurring carcinogens, exposure to oncogenic viruses such as the human leukemia tumour viruses (HLTV I, II, or III), or chance exposure to ionizing radiation may result in initiated cells being present in the tissues and again lead to cancer promoting agents being identified as complete carcinogens as a consequence of the bioassay conditions.

Such agents do not act positively in *in vitro* or *in vivo* tests for genotoxicity and have been identified as non-genotoxic carcinogens. For example, the pharmaceutical salbutamol, which is a beta-adrenergic stimulant used for the treatment of bronchial asthma, is non-genotoxic. It induced mesovarian leiomyomas in rats but not in mice or hamsters. Experimental evidence indicated that, in this particular case, the observation of tumour induction is most unlikely to be relevant to humans. Tumour induction was shown to be due to high levels of the agent continuously relaxing the muscular tissue and the consequential proliferation of the muscle cells.

Ashby and Tennant (1988) compared the results obtained with 222 chemicals in the NCI/NTP Bioassay Program with the results of structure-activity determinations and the Ames *Salmonella*/microsome assay as an example of a typical and well-established *in vitro* genotoxicity test. They found a higher level of correlation between chemicals that possessed a carcinogen-like chemical structure and the *Salmonella* assay than between the *in vitro* test and the results of the cancer bioassay. The major reason for this may lie in the far greater sensitivity of the *in vitro* test compared with the rodent cancer bioassay (Douglas *et al.* 1988). Douglas *et al.* (1988) stressed the importance of distorted metabolism that favoured metabolic activation, artificially reduced DNA repair capacity, and several other factors that each contributed to the greater sensitivity of the *in vitro* tests.

Two broad tumour profiles were found by Ashby and Tennant (1988):

1. The genotoxic but not the non-genotoxic carcinogens were effective in a group of about 26 tissues, including the stomach, Zymbal's glands (ear ducts), subcutaneous tissues, and circulatory system.

2. Both genotoxic and non-genotoxic carcinogens were effective in the remaining 13 tissues examined, especially the mouse liver, which accounted for 24% of all observations of tumour in this series.

Moreover, non-genotoxic carcinogens were found to induce single types of tumours in single species much more frequently than did genotoxic carcinogens.

These observations suggest that genotoxic carcinogens have a wider and greater ability to induce cancer than do non-genotoxic carcinogens. This is definitely not adequate, by itself, to imply that non-genotoxic carcinogens are unlikely to affect humans. A clear example of a formally non-genotoxic human carcinogen is asbestos, which has led, through unknown mechanisms, to cancer of the lung and mesotheliomas (lining tissue tumours) of the pleura and peritoneum in both men and women exposed to asbestos-contaminated atmospheres in the course of their employment (Selikoff and Lee 1978).

Although there should be no doubt that genotoxic carcinogens – i.e., agents that are both carcinogenic in the rodent bioassay and positive in a series of tests for genotoxicity – have the potential to lead to cancer at some level in exposed humans, it may, in specific cases, be possible to demonstrate that non-genotoxic carcinogens are unlikely to affect humans. There are two initial but completely

necessary lines of inquiry to establish such a conclusion. It is first necessary to perform further tests for genotoxicity, both *in vitro* and *in vivo*, to ensure that genetic changes known to be effective in the activation of human or animal oncogenes are not induced by the agent in question. It may also be considered desirable to isolate the tissue DNA to ensure that the agent has not led to DNA-carcinogen adducts or other forms of DNA damage. The second and more demanding area of investigation is to determine how the agent may have induced cancer by a non-genotoxic mechanism and then to set up suitable experiments to determine whether or not this mechanism will occur in humans under the actual or perceived conditions of exposure. This approach, which will seldom be easy, will require multidisciplinary research. Scientists have two currently identifiable conditions where a presumption that a non-genotoxic carcinogen is "safe for humans" is possible. These will be considered in the next section.

In the case of genotoxic carcinogens, or non-genotoxic carcinogens that appear likely to affect humans, a series of more demanding scientific considerations is necessary. It is a first requirement to determine the levels of the agent and its metabolites in tissues of different species and, in addition, to determine the times for which these concentrations persist. It is very unlikely that such studies will demonstrate absolute differences in the metabolites produced by different species, but they may assist in the eventual evaluation by suggesting that the test agent is likely to be more or less effective in humans than in the test species. It is also necessary to determine whether the use of high dose levels has the potential to affect the pattern of metabolism of the test agent. The saturation of certain metabolic pathways may, for example, distort the pattern of metabolism at high dose levels, such as the Maximum Tolerated Dose used in the cancer bioassay (Gehring and Blau 1977). Consideration should also be given to other factors that may differ between humans and surrogate species, including hormone levels, cellular proliferation, and the specific nature of the oncogenes involved in tumorigenesis. Overall, such considerations are likely to lead to quantitative rather than qualitative interspecies differences in response to a carcinogen.

6.3 Weight of the Evidence Approach

The weight of the evidence approach implies that the regulatory officials assemble all the data on the agent under consideration and attempt to base their conclusions on the total package rather than rely solely on any individual item. For example, in Canada, it is required that every food additive and every pesticide be subjected to a carcinogenesis bioassay in both sexes of two species, using a protocol similar to that discussed in Chapter 4.

No treatment-related carcinogenicity in two satisfactorily conducted bioassays would normally be sufficient for the evaluator to conclude that there is no concern for the test chemical's carcinogenic potential. If, however, evidence from other investigations is disquieting – e.g., (i) a range of positive *in vitro* and/or *in vivo* genotoxicity tests, (ii) the production of a range of pathological lesions that might be considered as possible tumour precursors, (iii) intensive and sustained cellular

proliferation (Clayson 1987, 1989; Clayson *et al.* 1989), suggesting the potential of the agent to enhance or even induce tumours by a non-genotoxic mechanism, or (iv) the chemical structure of the agent strongly suggests it may have carcinogenic potential (as has occurred with certain nitrofurans used in veterinary medicine) (Garner *et al.* 1984) – the evaluator may decide that the overall data are possibly inconsistent and that these inconsistencies have to be addressed. Further carcinogenesis bioassays, for example, may present one option. Such additional bioassays should preferably use a different species or strain of test animal. The weight of the evidence approach gives the evaluator or the regulator the flexibility to challenge apparently inconsistent evidence.

The approach may also be valuable in the case of false-positive results – i.e., chemicals that would be predicted to be negative in humans but, in fact, give positive results in one or more bioassays in animals. At least two general situations in which this might occur have been identified (Clayson 1987). The first of these is the presence of high yields of tumours in particular tissues in untreated animals; the second is the possibility that tissue-specific high-dose toxicity has intervened to enhance the process of carcinogenesis. Further areas of difficulty may well be discovered in view of the intense current research effort being directed to understanding the genesis of particular rodent tumours, such as those of the rat thyroid, kidney, and pancreas.

6.3.1 Background Tumours

Both the International Agency for Research in Cancer (IARC) and the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) recognize that substantial yields of tumours in untreated animals lessen the significance of tumours induced in the affected tissues. IARC's caveat is more general than EPA's (Table 6-1), which is limited to "marginal" increases in tumour yields. In neither case is there an adequate discussion of what level of these naturally occurring tumours constitute a problem in interpreting the significance of the carcinogenesis bioassay.

Table 6-1
The U.S. Environmental Protection Agency's (1984) classification of carcinogens

Group A: Human Carcinogens
Used when there is sufficient evidence of human carcinogenicity, from epidemiological studies, to support a causal association between exposure to the agent(s) and cancer.

Group B: Probable Human Carcinogens

Includes agents for which the evidence for human carcinogenicity from epidemiological studies ranges from almost sufficient to inadequate.

Group B1 is reserved for agents for which there is at least limited evidence of carcinogenicity in humans from epidemiological studies. In the absence of adequate data in humans, it is reasonable, for practical purposes, to regard agents for which there is sufficient evidence of carcinogenicity in mammals as if they presented a carcinogenic risk to humans.

Group B2 is reserved for agents for which there is inadequate human but sufficient animal evidence of carcinogenicity.

Group C: Possible Human Carcinogens

Used for agents with limited evidence of carcinogenicity in animals in the absence of human data:

a. definite malignant tumour response in a single, well-conducted animal experiment;

b. marginal tumour response in studies of inadequate design or reporting;

c. benign but not malignant tumours, with an agent showing no response in a variety of short-term tests for mutagenicity;

d. marginal response in a tissue known to be at high risk of tumour formation.

Group D: Not Classified

Used for agents with inadequate evidence of carcinogenicity.

Group E: No Evidence of Carcinogenicity

Used with agents that show no evidence of carcinogenicity in at least two adequate animal tests in different species or in both animal and epidemiological studies.

A transposable oncogene has been implicated in the genesis of the male B6C3F1 mouse liver tumour, which is one of the most worrisome of the background tumours in the standard carcinogenesis bioassay. It therefore appears reasonable to assume that these tumours arise through a genetic event (oncogene transposition to a favoured site in the genome) followed by the tumour developmental phase. In considering the significance of the induction of these tumours in a carcinogenesis bioassay, it is necessary to attempt to decide whether they arose as a result of (i) chance variation in tumour yields, which, in untreated male B6C3F1 mice kept according to standard protocols for two years, ranged from 15% to 60%, (ii) the test agent promoting the development of these tumours, possibly, for example, by increasing the rate of cell proliferation in the tissue in which cells normally turn over very slowly indeed, (iii) the test agent acting on hormonal interactions to modify tumour incidences, or (iv) the test agent acting as

a complete carcinogen, both initiating and promoting these tumours (i.e., the chemical both activates the necessary oncogenes and enhances tumour development).

The existence of these alternatives makes the use of tumour yields obtained against a high background of the same lesions in the untreated animals less than satisfactory. For this reason, IARC regards such tumours as providing only limited evidence of carcinogenicity. IARC also notes that in some cases, such as the mouse liver tumour, there is a difficulty in differentiating between benign and malignant tumours, so that it is difficult to use malignancy as an aid in assessing the significance of these tumours. An evaluator, using the weight of the evidence approach, has the opportunity to consider the results of both *in vivo* genotoxicity tests and structure-activity relationships of the test agent against known carcinogens. If these comparisons lend weight to the concept that the test agent is a genotoxic carcinogen, the evaluator may require further carcinogenesis bioassay or may recommend immediate regulatory action. Such an approach may in some cases be highly relevant to public health. For example, the notorious human occupational bladder carcinogen, 2-naphthylamine, when tested conventionally in both rats and mice, gave only mouse liver tumours, despite its activity as a human carcinogen.

Because the male but not the female B6C3Fl mouse develops a high background incidence of liver tumours, there is a tendency to regard significantly increased incidences of these tumours in female mice as valid indicators of the carcinogenicity of the test agent. Again, use of the weight of the evidence approach is advisable. The necessary use of the Maximum Tolerated Dose (MTD) in the bioassay (see Section 4.2.4) carries the risk of inducing some toxicity in the test animals. The evaluator should be assured that possible toxicity at the MTD does not result in the female mouse being "defeminized" and acting in a male manner in respect to tumour development.

The problems associated with mouse liver and lung tumours (particularly in the Strain A mouse; see Section 4.2.9.3) have been extensively discussed, and their utility in carcinogen assessment has been questioned. No such effort has been devoted to deciding what level of background tumours in other tissues of untreated animals is sufficient to constitute a problem to the evaluator in deciding upon the significance of induced tumours in such tissues. The problem is even more difficult than may be superficially apparent, as there is a need to be aware of tumours in control animals that may arise shortly after the completion of the normal bioassay. For example, in the "mega-mouse" experiment (Staffa and Mehlman 1979), the female BALB/C mouse was chosen because by 24 months it developed only a low incidence of mouse liver tumours. It was found that mice kept until they were 33 months of age developed over 30% of these tumours, a yield that might lead to the difficulties addressed in this section. It would be interesting, as a start to the solution of this problem, to determine how many of the 13 tissues identified by Ashby and Tennant (1988) as being subject to tumour

induction by both genotoxic and non-genotoxic carcinogens in fact possess a sufficiently high background tumour incidence to lead to the types of difficulty addressed here.

6.3.2 High-dose Toxicity

The reasons for the use of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and the way it is at present defined were discussed in Section 4.2.4. It is not easy to accurately predetermine the MTD; as a result, some bioassays may be performed at dose levels appreciably above the MTD. If these give evidence of a carcinogenic effect because of excessive dosing, it is difficult for the evaluator to ignore the result even if a major condition required for a good bioassay is being violated and the high-dose toxicity may be contributing to the induction of cancer.

The possible ramifications of high-dose toxicity in a cancer bioassay are best illustrated by an example. The problems involved have thus far been studied in only a few cases and illustrate the need for the weight of the evidence approach.

6.3.2.1 Butylated Hydroxyanisole

Butylated hydroxyanisole (BHA) is one of three phenolic antioxidants permitted to be added to food in Canada. These chemicals prevent foods from becoming rancid during transportation and storage. The phenolic antioxidants thus play a key role in permitting the modern centralized food industry to provide the Canadian public with a palatable food supply at all seasons of the year.

In 1982, Ito and his colleagues in Japan reported that 2% dietary BHA induced papillomas and carcinomas of the rat forestomach and subsequently showed that hamsters but not mice reacted similarly to high levels of BHA. The agent was, on all the available evidence, a non-genotoxic carcinogen whose chemical structure was not similar to that of any recognized carcinogen. Health Protection Branch scientists used two techniques in their investigations: straightforward pathological examination, and tritiated thymidine autoradiography. In rats fed 2% BHA for nine or 27 days, it was shown that BHA induced inflammation and cellular proliferation, particularly in the lesser curvature of the rat forestomach, the area in which most of the induced tumours had been reported. Moreover, a BHA dose-response study conducted at nine days, using [^{3}H]-thymidine autoradiography, demonstrated a no-observed-effect level (NOEL) or threshold at 0.25% BHA in the diet. This NOEL was also observed in a 91-day study. Some other phenols were fed to rats and were shown to increase cellular proliferation in the rat forestomach (Nera *et al.* 1984).

Canada also participated in an international study to determine whether BHA had any effect in species without a forestomach. The highest tolerated levels of BHA were fed to pigs (Denmark), dogs (United States and Japan), and non-human primates (Canada) for periods lasting for three to 18 months. In none of these

short-term studies was any biologically significant effect observed that was similar to those observed in rats and hamsters. This and other studies make it very unlikely that food exposures to BHA will affect humans.

BHA is not the only rodent carcinogen that has been actively investigated to determine whether or not it is likely to induce cancers in humans. There is currently a great volume of work directed towards determining, for example, whether hypolipidemic drugs and other rodent "peroxisome proliferators," which induce liver carcinomas in rodents, could have the same effect in humans. Similarly, certain substances have the ability to induce kidney tumours in male rats and are being examined to determine whether these non-genotoxic effects are relevant to humans. Chemicals that upset rodent thyroid function (i.e., goitrogens) are now suggested to demonstrate a threshold level or NOEL (Paynter *et al.* 1985). These and other efforts have the potential to strengthen greatly the accuracy of predicting the probable potency of rodent carcinogens in humans. Recent reviews (Clayson 1989; Clayson *et al.* 1989) discuss those tumours that appear to arise by similar mechanisms.

6.4 Conclusions

1. If there is sufficient evidence that an agent is carcinogenic in humans as a result of adequate epidemiological studies, there should be no hesitation in accepting the potential of that agent to cause human cancer.

2. If the evidence of carcinogenicity to humans as a result of epidemiological studies is limited and there is adequate evidence of carcinogenicity in one appropriate species of experimental animal, there should again be no hesitation in accepting that the agent has the potential to cause cancer in humans. If there is no animal evidence and limited human evidence, prudence would suggest appropriate regulatory action.

3. In the absence of human evidence, sufficient animal evidence of carcinogenicity in two species, combined with positive *in vitro* or *in vivo* genotoxicity data, should be presumed to indicate that an agent is probably carcinogenic in humans.

4. In Conclusions 1–3, the only point at issue is the extent to which the agent will be effective within a specific human population and the level of risk to that population.

5. If there is sufficient evidence of carcinogenicity in animals and an adequately conducted range of negative genotoxicity test results is available, there is some room for further experimentation to demonstrate whether or not the agent is likely to be carcinogenic in humans. Without this further evidence, it may not be possible to judge whether or not there are grounds to decide that the agent is unlikely to affect humans. Two examples have been cited in which it may be possible to reach such a decision: (i) if there is a high background incidence of

tumours in the affected tissues of untreated animals used in the bioassay, or (ii) where there is substantial evidence that the induced tumours may be a consequence of high-dose toxicity in the test animal.

6. Satisfactory negative evidence that an agent is not a carcinogen may be based on negative results in two species, conducted according to the protocols described in this text, provided that all ancillary evidence, including genotoxicity data, is consistent with this conclusion.

7. If the evidence falls short of the standards set out in Conclusions 1–5 above, the regulatory official must decide whether and what additional data are necessary.

7. Regulation of Carcinogens

The determination that a chemical is an animal carcinogen and the weight of the evidence approach to assess the risk to humans are only the first stages in the management of a chemical carcinogen. There is also the need to assess the magnitude of the risk presented by the perceived or actual level of human exposure (risk assessment) (Health and Welfare Canada 1989) and then to place this level of risk into the context of the legal mandate, economic factors, sociological considerations, and the possible public reaction to the perceived risk, before reaching a decision on the necessary level of regulation (risk management).

Society's requirement for the ordered sequence of risk assessment and risk management have dictated that regulatory agencies responsible for various areas of human health utilize different approaches to carcinogen regulation. Thus, in the case of direct man-made human food additives and, to a growing extent, pesticides, determination that the agent is a carcinogen may lead to the prohibition of the chemical for such uses. Food contaminants that may be due to naturally occurring mold procducts (e.g., aflatoxin B1, Ochratoxin) require different treatment, as the total prohibition of all contaminated material would seriously compromise the available food supply. Rather, they can be effectively regulated by placing an upper limit on their allowable concentrations in the contaminated human and/or animal food supply. Other contaminants may, for example, arise through the migration of components of packaging materials into the food and will require regulation designed to lead to safer packaging materials.

The regulation of pharmaceuticals addresses a different set of problems, because the individual taking the risk, the patient, is also the person who stands to gain the benefit. In the case of "over the counter" drugs that are self-administered and may therefore be abused, as well as those used for less life-threatening ailments for which there are usually alternate treatment modalities, the regulator may be willing to tolerate only minimum risk. There is less concern about the carcinogenic potential of drugs used to control, ameliorate, or cure terminal diseases. Patients with such conditions are unlikely to survive long enough to develop new cancers if they are left untreated. However, the compassionate use of carcinogenic drugs can be permitted only in close cooperation with the medical profession, which must use these substances only for the purposes for which they are intended.

Prohibition of industrial chemicals may lead to major economic losses to industry and the community, as well as the loss of socially desirable products. The hazard must be controlled by vigorous protective measures for workers and facilities to ensure that there is a minimum level of risk for workers.

Environmentally dispersed chemicals, especially those contaminating the air and drinking water, present still further problems. Such substances are generally present at low levels but have the potential to expose entire human populations. Their points of emission are often difficult to locate and may transcend national borders and hence may be extremely difficult to control. Also, in the case of drinking water, chlorination that is necessary to protect the public from exposure to infectious bacteria and other organisms likewise increases the degree of contamination by introducing low levels of a large number of potentially carcinogenic chlorinated compounds. A further difficulty arises because air and drinking water pollution is generally due to extremely complex mixtures of low levels of a wide variety of different substances, whereas carcinogenicity bioassays are mostly confined to the investigation of single agents. The setting of Maximum Allowable Concentrations (MACs) (Federal-Provincial Subcommittee on Drinking Water 1989) for specific chemicals therefore presents an extremely difficult problem.

It is noteworthy, however, that lifestyle components such as cigarette smoking and diet, which are recognized as the most prominent causes of cancer and heart disease in most developed countries, cannot be controlled by regulation alone. Public education appears to be the only feasible approach to minimizing risks from these important human carcinogens.

8. *Quo Vadis*? The Future of the Carcinogenesis Animal Bioassay

It is clear that the high cost of the carcinogenesis bioassay, both in highly trained personnel and in resources, precludes the immediate bioassay of the majority of chemicals for which testing may be deemed desirable. It is now necessary to begin afresh the task of deciding which substances most need testing, which look so much like carcinogens that testing may be considered unnecessary, and which appear likely to lack carcinogenicity.

At present, the use of well validated *in vivo* and/or *in vitro* genotoxicity tests (Health and Welfare Canada 1989) and the use of structure-activity relationships (SARs) employing computer-based artificial intelligence systems (Rosenkranz and Klopman 1990) offer considerable promise that the carcinogenic activity of many, but, as yet, not all, agents may be predictable. Such scientifically based considerations may go some way to reduce the present dependence on the bioassay. However, many further chemicals will need to be tested before this major rodent bioassay becomes redundant.

Knowledge of how and why cancers arise – i.e., the mechanisms of carcinogensis – promises to be of great use in the identification of effective carcinogens, using similar approaches to those already advocated for the assessment of the risk from known carcinogens by means of the weight of the evidence approach for the extrapolation of the results of rodent bioassays to humans. However, major advances in the biology and, especially, the molecular biology of the carcinogenic process are needed before accurate prediction of human-active agents will be feasible.

The majority of carcinogenesis bioassays that have so far been performed were designed to test man-made chemicals, such as pesticides, substances added to or migrating into the food supply, those arising as a result of mould contamination or cooking of food, those used as drugs for non-terminal conditions, those contaminating the general environment, and those reaching biologically significant levels in the workplace. These chemicals are susceptible to regulatory control, and therefore the bioassays may be seen to be valuable in protecting the public health.

Naturally occurring, intrinsic components of the food supply were believed, in many cases, not to merit testing because no regulatory action short of prohibiting the consumption of complete food crops was deemed possible. This position has radically changed with the advent of biogenetic engineering techniques that enable the plant developer to radically modify the genome of food-producing plants. If, as seems probable from the 35% of human cancer that is associated with diet or nutrition in the United States (Doll and Peto 1981), food plants contain naturally occurring carcinogens, it may be conceived that biogenetically

engineered food crops could be beneficial insofar as they contain lower levels of these noxious agents; conversely, they could be disastrous if the level of these agents is significantly raised.

The public health approach to this possibility clearly needs identification of potentially carcinogenic natural constituents of the food supply, such as the phytolectins, and an attempt to monitor their concentrations in the original and modified crops, such as excess solanine in a novel potato and 8-hydroxypsoralen in modified celery. Naturally occurring carcinogens in the food supply require identification, if only because it will be extremely difficult to identify them as a cause of increased human cancer, by epidemiological means, in the future. It should not be assumed that all crop-borne carcinogens will necessarily possess the same molecular parameters as man-made carcinogens.

9. References

Abraham, S., Lowenstein, F.W. and O'Connell, D.E. (1976). Preliminary findings of the First Health and Nutrition Examination Survey, United States 1971-1972. Dietary intake and biochemical findings. DHEW Publication No. (HRA) 76-1219-1. National Center for Health Statistics, Rockville, Md. Health Resources Administration, Washington, D.C.

ACGIH (19ACGIH (1987). Threshold limit values and biological exposure indices for 1987-1988. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio.

Agriculture Canada (1987). Food Residue Monitoring Consolidation Program. Pesticides Directorate.

Aitio, A. (1984). Sources of error and quality control in biological monitoring. In: *Biological monitoring and surveillance of workers exposed to chemicals*. Edited by: A. Aitio, V. Riihimaki, and H. Vainio. Hemisphere Publ. Corp., Washington, D.C. pp. 263-272.

Aitio, A. and Jarvisalo, J. (1985). Biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals: collection, processing and storage of specimens. Ann. Clin. Lab. Sci. 15(2):121-139.

Andersen, M.E., Clewell III, H.J., Gargas, M.L., Smith, F.A. and Reitz, R.H. (1987). Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment for methylene chloride. Toxicol. Appl. Pharmacol. 87:185-205.

Armitage, P. (1985). Multistage models of carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 63:195-201.

Armitage, P. and Doll, R. (1961). Stochastic models for carcinogenesis. In: *Fourth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. University of California Press, Berkeley, Calif. pp. 19-38.

Arnold, D.L., Grice, H.C. and Krewski, D.R. (1990). Handbook of *in vivo* toxicity testing. Academic Press, San Diego, Calif.

Ashby, J. and Tennant, R.W. (1988). Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the United States NCI/NTP. Mutat. Res. 204:17-115.

Barbacid, M. (1986). Oncogenes and human cancer: cause or consequence? Carcinogenesis 7:1037-1042.

Barr, J.T. (1985). The calculation and use of carcinogenic potency: a review. Regul. Toxicol. Pharmacol. 5:432-459.

Bazzarre, T.L. and Myers, M.P. (1978). The collection of food intake data in cancer epidemiology studies. Nutr. Cancer 1(4):22-45.

Bennett, B.G. (1986). Exposure assessment for metals involved in carcinogenesis. IARC Sci. Publ. 71:115-127.

Berenblum, I. and Shubik, P. (1947a). The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin. Br. J. Cancer 1:379-382.

Berenblum, I. and Shubik, P. (1947b). A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. Br. J. Cancer 1:383-391.

Berenblum, I. and Shubik, P. (1949). The persistence of latent tumour cells induced in the mouse's skin by a single application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. Br. J. Cancer 3:384-386.

Bernard, A. and Lauwerys, R. (1986). Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. J. Occup. Med. 28(8):558-562.

Bernard, A. and Lauwerys, R. (1987). General principles for biological monitoring of exposure to chemicals. In: *Biological monitoring of exposure to chemicals and organic compounds*. Edited by: M.H. Ho and H.K. Dillon. John Wiley & Sons, New York, N.Y. pp. 1-16.

Bernstein, L., Gold, L.S., Ames, B.N., Pike, M.C. and Hoel, D.G. (1985). Some tautologous aspects of the comparison of carcinogenic potency in rats and mice. Fundam. Appl. Toxicol. 5:79-86.

Bretthauer, E.W. (1989). Exposure assessment research at EPA: Keynote address at 1989 Environmental Protection Agency and Air and Waste Management Association Symposium on Total Exposure Assessment Methodology – A New Horizon, November 27-30, Las Vegas, Nev.

Bristol, D.W., MacLeod, K.E. and Lewis, R.G. (1984). Direct and indirect chemical methods for exposure assessment. Stud. Environ. Sci. 24:79-119.

Brown, C.C. and Koziol, J.A. (1983). Statistical aspects of the estimation of human risk from suspected environmental carcinogens. SIAM Rev. 25:151-181.

Brown, K.G. and Hoel, D.G. (1983). Modelling time-to-tumor data: Analysis of the ED_{01} study. Fundam. Appl. Toxicol. 3:458-469.

Callahan, M.A. (1987). Science and exposure assessment. Environ. Sci. Technol. 21:1139.

Canadian Cancer Society (1990). Canadian cancer statistics. Toronto, Ont.

Canadian Environmental Contaminants Advisory Committee on Mutagenesis (1986). Guidelines on the use of mutagenicity tests in toxicological evaluation of chemicals. Published by the authority of the Minister of Health and Welfare and the Minister of the Environment, Ottawa, Ont.

Center for Disease Control (1972). Ten State Nutrition Survey 1968-1970. DHEW Publ. No. (HSM) 72-8130, 72-8132, 72-8133. Health Services and Mental Health Administration, Washington, D.C.

Clayson, D.B. (1962). Chemical carcinogenesis. Little-Brown, Boston, Mass.

Clayson, D.B. (1976). Occupational bladder cancer. Prev. Med. 5:228-244.

Clayson, D.B. (1982). Carcinogenesis in the developing organism: Could protocols for testing be improved? Int. J. Biol. Res. Pregnancy 2:150-158.

Clayson, D.B. (1987). The need for biological risk assessment in reaching decisions about carcinogens. Mutat. Res. 184:243-269.

Clayson, D.B. (1989). Can a mechanistic rationale be provided for non-genotoxic carcinogens identified in rodent bioassays? Mutat. Res. 221:53-67.

Clayson, D.B. and Krewski, D.R. (1990). Objectives of toxicity testing. In: *Handbook of in vivo toxicity testing*. Edited by: D.L. Arnold, H.C. Grice, and D.R. Krewski. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 3-18.

Clayson, D.B., Iverson, F., Nera, E., Lok, E., Rogers, C., Rodrigues, C., Page, D. and Karpinski, K. (1986). Histopathological and radioautographical studies on the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole and related chemicals. Food Chem. Toxicol. 24:1171-1182.

Clayson, D.B., Nera, E.A. and Lok, E. (1989). The potential for the use of cell proliferation studies in carcinogen risk assessment. Regul. Toxicol. Pharmacol. 9:284-295.

Cohen, B.S., Harley, N.H. and Lippmann, M. (1984). Bias in air sampling techniques used to measure inhalation exposure. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 45:187-192.

Conacher, H.B.S., Graham, G.F., Graham, R.A., Newsome, W.H. and Verdier, P. (1989). The Health Protection Branch Total Diet Program: An overview. J. Inst. Can. Technol. Aliment. 22:322-326.

Coomes, T.J., Sherlock, J.C. and Walters, B. (1982). Studies in dietary intake and extreme food consumption. R. Soc. Health J. 102:119-123.

Coye, M.J., Lowe, J.A. and Maddy, K.J. (1986). Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: II. Monitoring of intact pesticides and their metabolites. J. Occup. Med. 28(8):628-636.

Crouch, E., Wilson, R. and Zeise, L. (1987). Tautology or not tautology? J. Toxicol. Environ. Health 20:1-10.

Crump, K.S. (1984). An improved procedure for low-dose carcinogenic risk assessment from animal data. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 5:339-348.

Dabeka, R.W. and Mckenzie, D. (1987). Lead, cadmium, and fluoride levels in market milk and infant formulas in Canada. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:754-757.

Davis, D.L. and Gusman, S. (1982). Exposure assessment: New frontier, old problems. Toxic Subst. J. 4:2-3.

Dolan, M.E., Oplinger, M. and Pegg, A.E. (1988). Sequence specificity of guanine alkylation and repair. Carcinogenesis 9:2139-2143.

Doll, R. and Peto, R. (1981). The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl. Cancer Inst. 66:1191-1308.

Douglas, G.R., Blakey, D.H. and Clayson, D.B. (1988). Genotoxicity tests as predictors of carcinogens: An analysis. Mutat. Res. 196:83-93.

Dourson, M.L. and Stara, J.F. (1983). Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors. Regul. Toxicol. Pharmacol. 3:224-238.

Droz, P.O. and Guillemin, M.P. (1986). Occupational exposure monitoring using breath analysis. J. Occup. Med. 28:593-602.

Durham, W.T. (1981). Introduction. In: *Dermal exposure related to pesticide use, discussion of risk assessment*. Edited by: R.C. Honeycutt, G. Zweig, and N.N. Ragsdale. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 273. pp. xiii-xiv.

Elder, R.L. (ed.) (1988). Final report on the safety assessment of methylene chloride. 15th report of the Cosmetic Ingredients Review (Expert Panel). J. Am. Coll. Toxicol. 7(6):741-835.

Enslien, K. (1987). Computer-assisted prediction of toxicity. In: *Toxic substances and human risk: Principles of data interpretation*. Edited by: R.G. Tardiff and J.V. Rodricks. Plenum Press, New York, N.Y. pp. 317-336.

Evans, W.K. (1989). Supportive care for patients with small cell lung cancer. Lung Cancer 5:319-324.

Federal-Provincial Subcommittee on Drinking Water (1989). Guidelines for Canadian drinking water quality. 4th edition. Prepared by the Federal-Provincial Subcommittee on Drinking Water of the Federal-Provincial Advisory Committee on Environmental and Occupational Health. Published by authority of the Minister for National Health and Welfare.

Foulds, L. (1969). Neoplastic development. Vol. 1. Academic Press, London, U.K.

Frank, R., Braun, H.E. and Ripley, B.D. (1987a). Residues of insecticides, fungicides and herbicides on Ontario grown vegetables, 1980-1985. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:1081-1086.

Frank, F., Braun, H.E. and Ripley, B.D. (1987b). Residues of insecticides, fungicides and herbicides in fruit produced in Ontario, Canada, 1980-1984. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39:272-279.

Franklin, C.A. (1989). Percutaneous absorption of pesticides. In: *Biological monitoring for pesticide exposure: Measurement, estimation, and risk reduction*. Edited by: R.G.M. Wang, C.A. Franklin, R.C. Honeycutt, and J.C. Reinert. Am. Chem. Symp. Ser. No. 382. pp. 126-130.

Franklin, C.A., Muir, N.I. and Greenhalgh, R. (1981). The assessment of potential health hazards to orchardists spraying pesticides. In: *Pesticide residues and exposure*. Edited by: J.R. Plimmer. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 182. pp. 157-168.

Franklin, C.A., Somers, D.A. and Chu, I. 1989. Use of percutaneous absorption data in risk assessment. J. Am. Coll. Toxicol. 8:815-827.

Freireich, E.J., Gehan, E.A., Rall, D.P., Schmidt, L.H. and Skipper, H.E. (1966). Quantitative comparison of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. Cancer Chem. Rep. 50:219-248.

Garner, R.C., Martin, C.N. and Clayson, D.B. (1984). Carcinogenic aromatic amines and related compounds. In: *Chemical carcinogens*. Vol. 1. 2nd edition. Edited by: C.E. Searle. Am. Chem. Soc. Monogr. No. 182. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 175-276.

Gart, J.J., Krewski, D., Lee, P.N., Tarone, R.E. and Wahrendorf, J. (1986). Statistical methods in cancer research. III. The design and analysis of long-term animal experiments. IARC Sci. Publ. 79.

Gartrell, M.J., Craun, J.C., Podrebarac, D.S. and Gunderson, E.L. (1986a). Pesticides, selected elements and other chemicals in adult total diet samples, October 1980 – March 1982. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69:146-161.

Gartrell, M.J., Craun, J.C., Podrebarac, D.S. and Gunderson, E.L. (1986b). Pesticides, selected elements and other chemicals in infant and toddler total diet samples, October 1980 – March 1982. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69:123-145.

Gaylor, D.W., Greenman, D.L. and Frith, C.H. (1985). Urinary bladder neoplasms induced in Bald/C female mice with low doses of 2-acetylaminofluorene. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 6:127-136.

Gehring, P.J. and Blau, G.E. (1977). Mechanism of carcinogenesis: Dose response. J. Environ. Pathol. Toxicol. 1:163-179.

Godfrey, K. (1983). Compartmental models and their application. Academic Press, London, U.K.

Gold, L.S., Sawyer, C.B., Magaw, R., Backman, G.M., de Veciana, M., Levinson, R., Hooper, N.K., Havender, W.R., Bernstein, L., Peto, R., Pike, M.C. and Ames, B.N. (1984). A carcinogenic potency database of the standardized results of animal bioassays. Environ. Health Perspect. 58:9-319.

Gold, L.S., Ward, J.M., Bernstein, L. and Stern, B. (1986). Association between carcinogenic potency and tumor pathology in rodent carcinogenesis bioassays. Fundam. Appl. Toxicol. 6:677-690.

Greenfield, R.E., Ellwein, L.B. and Cohen, S.M. (1984). A general probabilistic model of carcinogenesis: Analysis of experimental urinary bladder cancer. Carcinogenesis 5:437-445.

Gunderson, E.L. (1988). FDA Total Diet Survey, April 1982 – April 1984. Dietary intakes of pesticides, selected elements and other chemicals. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:1200-1209.

Gunner, S.W. and Kirkpatrick, D.C. (1979). Approaches for estimating human intakes of chemical substances. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 12:27-31.

Hammond, E.C., Selikoff, I.J., Lawther, P.L. and Seidman, H. (1976). Inhalation of benzopyrene and cancer in man. Ann. N.Y. Acad. Sci. 271:116-124.

Hardisty, J.F. and Eostis, S.L. (1990). Toxicological pathology; a critical stage in study interpretation. In: *Progress in predictive toxicology*. Edited by: D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, and J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 41-62.

Haseman, J.K. and Huff, J.E. (1987). Species correlations in long term carcinogenicity studies. Cancer Lett. 37:125-132.

Health and Welfare Canada (1989). Issues, food chemical contaminants – Assessing health risks. Health Protection Branch, Ottawa, Ont.

Health and Welfare Canada (1990). Drugs Directorate guidelines. Ottawa, Ont.

Henschler, D. (1984). Exposure limits: History, philosophy, future developments. Ann. Occup. Hyg. 28(1):79-92.

Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina: Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. N. Engl. J. Med. 284:878-881.

Hoel, D.G., Kaplan, N.L. and Anderson, M.W. (1983). Implication of nonlinear kinetics on risk estimation in carcinogenesis. Science 219:1032-1037.

Homan, E.R. (1972). Quantitative relationships between toxic doses of anti-tumor chemotherapeutic agents in animals and man. Cancer Chem. Rep. 3:13-19.

Hushon, J.M. and Clerman, R.J. (1981). Estimation of exposure to hazardous chemicals. In: *Hazard assessment of chemicals. Current developments*. Vol. 1. Edited by: J. Saxena and F. Fisher. Academic Press, New York, N.Y. pp. 324-388.

IARC (1972-1987). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vols. 1-42. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC (1984). Models, mechanisms and etiology of tumor promotion. IARC Monogr. No. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

IARC (1987). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans. Suppl. 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Ito, N., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T. and Fukushima, S. (1982). Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole. Gann 73:332-334.

Juchau, M. and Harris, C. (1990). Age: The developing organism as a toxicological target. In: *Progress in predictive toxicology*. Edited by: D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, and J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 91-111.

Kinzel, V., Fürstenberger, G., Loehrke, H. and Marks, F. (1986). Three stage tumorigenesis in mouse skin: DNA synthesis as a prerequisite for the conversion stage induced by TPA prior to initiation. Carcinogenesis 7:779-782.

Klein, G. (1987). The approaching era of the tumor suppressor genes. Science 238:1539-1545.

Klein, G. and Klein, E. (1984). Commentary: Oncogene activation and tumour progression. Carcinogenesis 5:429-435.

Konstantinov, V.G. and Kuz'minykh, A.T. (1971). Resinous substances and 3,4-benzpyrene in the air of electrolysis shops of aluminum plants and their role in carcinogenesis. Gig. Sanit. 36:39-42.

Krewski, D. and Franklin, C.A. (1991). Statistics in toxicology. Gordon & Breach Science Publishers, New York, N.Y.

Krewski, D. and Murdoch, D. (1988). Quantitative factors in carcinogenic risk assessment. In: Carcinogen risk assessment: New directions in the qualitative and quantitative aspects. Banbury Report 31. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Krewski, D. and Van Ryzin, J. (1981). Dose response models for quantal response toxicity data. In: *Statistics and related topics*. Edited by: M. Csorgo, D. Dawson, J.N.K. Rao, and E. Saleh. North-Holland, Amsterdam. pp. 201-231.

Krewski, D., Murdoch, D.J. and Withey, J.R. (1987). The application of pharmacokinetic data in carcinogenic risk assessment. In: *Drinking water and health*. Vol. 8. Pharmacokinetics and risk assessment. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 441-468.

Krewski, D., Murdoch, D. and Withey, J.R. (1989). Recent developments in carcinogenic risk assessment (with discussion). Health Phys., Suppl. 1:313-326.

Krewski, D., Szyszkowicz, M. and Rosenkranz, H. (1990a). Quatitative factors in chemical carcinogenesis: Variation in carcinogenic potency. Regul. Toxicol. Pharmacol. 12:13-29.

Krewski, D., Goddard, M.J. and Withey, J.R. (1990b). Carcinogenic potency and interspecies extrapolation. In: Mutation and the environment, Part D: Carcinogenesis. Edited by: M.L. Mendelsohn and R.J. Alberdini. Wiley-Liss, New York, N.Y. pp. 323-334.

Krewski, D., Gaylor, D.W. and Szyszkowicz, M. (1991). A model-free approach to low dose extrapolation. Environ. Health Perspect. 90:279-285.

Kutz, F.W. (1983). Chemical exposure monitoring. Residue Rev. 85:277-292.

Linstedt, S.L. (1987). Allometry: Body size constraints in animal design. In: *Drinking water and health*. Vol. 8. Pharmacokinetics in risk assessment. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 65-79.

Lippmann, M. (1987). Human exposures and dose to target tissues. In: *Toxic chemicals, health and the environment*. Edited by: L.B. Lave and A.C. Upton. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.

Livingstone, S.K. (1953). Carcinogens in alumina reduction. Med. World 78:31-33.

Lok, E., Nera, E.A., Iverson, F., Scott, F., So, Y., and Clayson, D.B. (1988). Dietary restriction, cell proliferation and carcinogenesis: A preliminary study. Cancer Lett. 38:249-255.

Lutz, W.K. (1990). Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis. Carcinogenesis 11:1[illegible]3-1247.

Maibach, H.I., Feldmann, R.J., Milby, T.H. and Serat, W.F. (1971). Regional variation in percutaneous penetration in man – Pesticides. Arch. Environ. Health 23:208-211.

Marr, J.W. (1971). Individual dietary surveys: Purposes and methods. World Rev. Nutr. Diet. 13:105-164.

Menzel, D.B. (1987). Physiological pharmacokinetic modeling. Environ. Sci. Technol. 21:944-950.

Metzger, B., Crouch, E. and Wilson, R. (1989). On the relationship between carcinogenicity and acute toxicity. Risk Anal. 9:169-177.

Moolgavkar, S.H. (1986a). Carcinogenesis modeling: From molecular biology to epidemiology. Annu. Rev. Public Health 7:151-169.

Moolgavkar, S.H. (1986b). Hormones and multistage carcinogenesis. Cancer Surv. 5:635-648.

Moolgavkar, S.H. and Luebeck, G. (1990). Two-event model for carcinogenesis: biological, mathematical, and statistical considerations. Risk. Anal. 10:323-341.

Moolgavkar, S.H., Dewanji, A. and Venzon, D.J. (1988). A stochastic two-stage model for cancer risk assessment. 1: The hazard function and the probability of tumor. Risk Anal. 8:383-392.

Morrisson, H.I., Semenciw, R.M., Mao, Y. and Wigle, D.T. (1988). Cancer mortality among a group of fluorspar miners exposed to radon progency. Am. J. Epidemiol. 128:1266-1275.

Murdoch, D.J. and Krewski, D. (1988). Carcinogenic risk assessment with time-dependent exposure patterns. Risk Anal. 8:521-530.

National Toxicology Program (1984). Report of the Ad Hoc Panel on Chemical Carcinogenesis Testing and Evaluation. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, D.C.

Nera, E.A., Lok, E., Iverson, F., Ormsby, E., Karpinski, K.F. and Clayson, D.B. (1984). Short-term pathological and proliferative effects of butylated hydroxyanisole and other phenolic antioxides on the forestomach of Fischer 344 rats. Toxicology 32:197-213.

Neumann, H.-G. (1984). Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents. Arch. Toxicol. 56:1-6.

Nutrition Canada (1976). Food consumption patterns report. A report from Nutrition Canada. Health and Welfare Canada.

OECD (1982). Good laboratory practice in the testing of chemicals; Final report of the Panel of Experts on Good Laboratory Practice. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

OECD (1984). Guidelines for the testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris.

Office of Science and Technology Policy (1985). Chemical carcinogens: A review of the science and its associated principles. Fed. Regist. 50:10372-10442.

O'Flaherty, E.J. (1981). Toxicants and drugs: Kinetics and dynamics. John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Pao, E.M., Fleming, K.H., Guenther, P.M. and Mickle, S.J. (1982). Foods commonly eaten by individuals: Amount per day and per eating occasion. Human Nutrition Information Service, U.S. Department of Agriculture.

Paynter, O.E., Burin, G.J., Jaeger, R.B. and Gregorio, C.A. (1985). Goitrogens and thyroid follicular cell neoplasia: Evidence for a threshold process. Regul. Toxicol. Pharmacol. 8:102-119.

Pekkarinen, M. (1970). Methodology in the collection of food consumption data. World Rev. Nutr. Cancer 12:145-171.

Pellizzari, E., Zweidinger, R.A. and Sheldon, L.S. (1988). Determination of benzene, toluene and xylene in breath samples by gas chromatography/mass spectrometry. IARC Sci. Publ. 85:267-279.

Peto, R., Pike, M.C., Bernstein, L., Gold, L.S. and Ames, B.N. (1984). The TD_{50}: A proposed general convention for the numerical description of the carcinogenic potency of chemicals in chronic-exposure animal experiments. Environ. Health Perspect. 58:1-8.

Pinkel, D. (1958). The use of body surface area as a criterion of drug dosage of cancer chemotherapy. Cancer Res. 18:853-856.

Pitot, H.C. and Sirica, A.E. (1980). The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochem. Biophys. Acta 605:191-215.

Portier, C.J. (1987). Statistical properties of a two-stage model of carcinogenesis. Environ. Health Perspect. 76:125-131.

Portier, N. and Kaplan, N. (1989). The variability of safe dose estimates when using complicated models of the carcinogenic process. A case study: Methylene chloride. Fundam. Appl. Toxicol. 13:533-544.

Ramel, C. (1986). Deployment of short term assays for the detection of carcinogens; genetic and molecular considerations. Mutat. Res. 168:327-342.

Reinert, J.C., Nielsen, A.P., Lunchick, C., Hernandez, O. and Mazzetta, D.M. (1986). The United States Environmental Protection Agency's guidelines for applicator exposure monitoring. Toxicol. Lett. 33:183-191.

Reitz, R.H. (1990). Distribution, persistence, and elimination of toxic agents (pharmacokinetics). In: *Progress in predictive toxicology*. Edited by: D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, and J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 79-90.

Rieth, J.P. and Starr, T.B. (1989). Chronic bioassays: Relevance to quantitative risk assessment of carcinogens. Regul. Toxicol. Pharmacol. 10:160-173.

Ritter, L. and Franklin, C.A. (1989). Use of biological monitoring in the regulatory process. In: *Biological monitoring for pesticide exposure: Measurement, estimation, and risk reduction*. Edited by: R.G.M. Wang, C.A. Franklin, R.C. Honeycutt, and J.C. Reinert. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. No. 382. pp. 354-367.

Rosenkranz, H.S. and Klopman, G. (1990). Structural basis of carcinogenicity in rodents of genotoxicants and non-genotoxicants. Mutat. Res. 228:105-124.

Rous, P. and Kidd, J.G. (1941). Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: A study of the tar tumors of rabbits. J. Exp. Med. 73:365-390.

Sawyer, C., Peto, R., Bernstein, L. and Pike, M.C. (1984). Calculation of carcinogenic potency from long-term animal carcinogenesis experiments. Biometrics 40:27-40.

Selikoff, I.J. and Lee, D.H.K. (1978). Asbestos and disease. Academic Press, New York, N.Y.

Severn, D.J. (1987). Exposure assessment: Fourth of a five part series on cancer risk assessment. Environ. Sci. Technol. 21(12):1159-1163.

Shimkin, M.B. and Stoner, G.D. (1975). Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassay. Adv. Cancer Res. 21:1-58.

Staffa, J.A. and Mehlman, M.A. (1979). Innovations in cancer risk assessment (ED01 Study). In: *Proceedings of a symposium sponsored by the National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration, and the American College of Toxicology.* Pathotox Publishers, Park Forest South, Ill. pp. 246

Statistics Canada (1981). Cancer in Canada. Catalogue No. 82-207 (annual). Ottawa, Ont.

Statistics Canada (1986). Apparent per capita food consumption in Canada. Catalogue Nos. 32-229 and 32-230; Parts I and II.

Swenberg, J.A., Fedtke, N., Fennell, T.R. and Walker, V.E. (1990). Relationships between carcinogen exposure, DNA adducts and carcinogenesis. In: *Progress in predictive toxicology.* Edited by: D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, and J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 161-184.

Tarone, R.E., Chu, K.C. and Ward, J.M. (1981). Variability in the rates of some naturally-occurring tumors in Fischer 344 rats and (C57BL/6N × C3H/HeN) F1 (B6C3F1) mice. J. Natl. Cancer Inst. 66:1175-1181.

Thériault, G., De Guire, L. and Cordier, S. (1981). Reducing aluminum: An occupation possibly associated with bladder cancer. Can. Med. Assoc. J. 124:419-425.

Thorslund, T. and Charnley, G. (1988). Quantitative dose-response models for tumor promoting agents. In: *Carcinogen risk assessment: New directions in qualitative and quantitative aspects.* Banbury Report No. 31, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 245-256.

Thorslund, T.W., Brown, C.C. and Charnley, G. (1987). Biologically motivated cancer risk models. Risk Anal. 7:109-119.

Travis, C.T. and White, R.K. (1988). Interspecies scaling of toxicity data. Risk Anal. 8:119-125.

U.S. Congress Office of Technology Assessment (1987). Identifying and regulating carcinogens. Chairman: M.K. Udall. OTA-BP-H-42. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

U.S. Environmental Protection Agency (1983a). Toxic substances control; good laboratory practice standards. Fed. Regist. 48:53922-53944.

U.S. Environmental Protection Agency (1983b). Pesticide programs; good laboratory practice standards. Fed. Regist. 48:53946-53969.

U.S. Environmental Protection Agency (1984). Guidelines for carcinogen risk assessment. Fed. Regist. 51:34014-34025.

U.S. Environmental Protection Agency (1986). Guidelines for estimating exposures. Fed. Regist. 51:34042-34054.

U.S. Environmental Protection Agency (1987a). Report of the EPA Workshop on the Development of Risk Assessment Methodologies for Tumor Promotors. U.S. EPA Report EPA/600/9-87/03, Washington, D.C.

U.S. Environmental Protection Agency (1987b). Pesticide assessment guidelines, Subdivision U. Applicator exposure monitoring. U.S. EPA Report PB87-133286.

U.S. Food and Drug Administration (1976). Nonclinical laboratory studies, proposed regulations for good laboratory practice. Fed. Regist. 41:51206-51230.

U.S. Food and Drug Administration (1989). Cosmetics; ban on the use of methylene chloride as an ingredient of cosmetic products. Fed. Regist. 54(124):27328-27342.

U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens (1986). Chemical carcinogens: A review of the science and its associated principles. Environ. Health Perspect. 67:201-282.

Vainio, H. (1985). Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens. Scand. J. Work Environ. Health 11:1-6.

Vainio, H., Hemminki, K. and Wilbourn, J. (1985). Data on the carcinogenicity of chemicals in the IARC Monographs programme. Carcinogenesis 6:1653-1665.

Wagner, J.G. (1971). *Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics*. Chapt. 4. Drug Intelligence Publications, Hamilton, Ill. pp. 18-25.

Wartenberg, D. and Gallo, M.A. (1990). The fallacy of ranking possible carcinogenic hazards using the TD_{50}. Risk Anal. 10:609-613.

Wattenberg, L.W. (1978). Inhibition of chemical carcinogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 60:11-18.

Weinstein, I.B. (1985). The relevance of tumour promotion and multistage carcinogenesis to risk assessment. In: *Risk quantitation and regulatory policy*. Banbury Report 19, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 231-240.

Whittemore, A. and Keller, J. (1978). Quantitative theories of carcinogenesis. SIAM Rev. 20:1-30.

WHO (1984). Recommended health-based occupational exposure for respiratory irritants. Report of a WHO Study Group. WHO Tech. Rep. Ser. No. 707. World Health Organization, Geneva.

WHO (1985). Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants. WHO Offset Publication No. 87. World Health Organization, Geneva.

WHO (1989). Guidelines for predicting dietary intakes of pesticide residues. UNEP/FAO/WHO Food Contamination Monitoring Program in collaboration with the Codex Committee on Pesticide Residues. World Health Organization, Geneva.

Wigle, D.T. (1977a). Bladder cancer: Possible new high-risk occupation. Lancet ii:83-84.

Wigle, D.T. (1977b). Breast cancer and fertility trends in Canada. Am. J. Epidemiol. 105:428-438.

Wigle, D.T. and Mao, Y. (1980). Mortality by income level in urban Canada. Health and Welfare Canada, Ottawa, Ont.

Wigle, D.T., Collishaw, N.E., Kirkbride, J. and Mao, Y. (1987). Deaths in Canada from lung cancer due to involuntary smoking. Can. Med. Assoc. J. 136:945-951.

Willis, R.A. (1960). Pathology of tumours. 3rd edition. Butterworth, London, U.K.

Yotti, L.P., Chang, C.C. and Trosko, J.E. (1979). Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter. Science 206:1089-1091.

Zeise, L., Wilson, R. and Crouch, E. (1984). Use of acute toxicity to estimate carcinogenic risk. Risk Anal. 4:187-199.

Zeise, L., Crouch, E.A.C. and Wilson, R. (1986). A possible relationship between toxicity and carcinogenicity. J. Am. Coll. Toxicol. 5:137-151.

Santé et Bien-être social Canada
Health and Welfare Canada

L'évaluation de la cancérogénicité

Canada

L'évaluation de la cancérogénicité

Rapport de recherche présenté au ministère
de la Santé nationale et du Bien-être social

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada, 1991
Cat. H49-69/1991
ISBN 0-662-58750-2

Comité de la cancérogenèse

D[r] E. Somers
Directeur général
Direction des médicaments
Immeuble de la Protection de la santé
bureau 107
Pré Tunney

D[r] D.B. Clayson
Division de la recherche toxicologique
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Immeuble Frederick G. Banting
2[e] étage
Pré Tunney

M[me] Pat Curry
Division des pesticides
Direction de l'hygiène du milieu
Immeuble Brooke-Claxton
Pré Tunney

D[r] C. Franklin
Chef, Division des intoxications environnementales et professionnelles
Bureau des dangers des produits chimiques
Direction de l'hygiène du milieu
Centre d'hygiène du milieu
bureau 118
Pré Tunney

D[r] D.L. Grant
Chef, Division de l'évaluation toxicologique
Bureau d'innocuité des produits chimiques
Direction des aliments
Immeuble Protection de la santé
bureau 2-2
Pré Tunney

D[r] D. Krewski
Chef, Division des statistiques biologiques et des applications informatiques
Direction de l'hygiène du milieu
Centre d'hygiène du milieu,
bureau 117
Pré Tunney

D[r] T. Matula
Chef, Section de la toxicologie génétique
Division de la toxicologie des médicaments
Bureau de recherche, médicaments
Direction des médicaments
2, Immeuble Frederick G. Banting Ouest
Pré Tunney

D[r] L. Ritter
Chef, Division des pesticides
Bureau des dangers des produits chimiques
Direction de l'hygiène du milieu
Centre d'hygiène du milieu
bureau B-43
Pré Tunney

D[r] D. Wigle
Chef, Surveillance des maladies et évaluation des risques
Bureau de l'épidémiologie des maladies chroniques
Laboratoire de lutte contre la maladie
Immeuble LLCM, bureau 37A
Pré Tunney

Table des matières

Page

Résumé 9

1. Introduction **15**
1.1 La loi et la surveillance des dangers pour la santé 15
1.2 Le cancer : la nature du problème 15
1.2.1 Mortalité et morbidité au Canada 15
1.2.2 Qu'est-ce que le cancer? 16
1.2.3 Cause du cancer 17
1.2.3.1 Virus 17
1.2.3.2 Radiations et radioisotopes 18
1.2.3.3 Agents physiques 18
1.2.3.4 Agents chimiques 19
1.3 Définitions 19

2. Épidémiologie **21**
2.1 Rôle de l'épidémiologie 21
2.2 Principes d'épidémiologie 21
2.3 Rapports de cas 22
2.4 Épidémiologie descriptive 22
2.4.1 Cancer de la vessie chez les travailleurs des raffineries d'aluminium 22
2.5 Études écologiques 23
2.5.1 Cancer du sein et tendances de la fertilité 23
2.5.2 Variation du risque de décès attribuable au cancer en fonction du revenu 24
2.6 Étude cas-témoins 24
2.7 Études de cohortes 25
2.7.1 Cancer du poumon induit par les radiations chez les mineurs de fluorine à Terre-Neuve 25
2.8 Études d'intervention 26
2.9 Interprétation des études épidémiologiques 26

3. Choix des substances chimiques à soumettre aux bio-essais de cancérogenèse **28**
3.1 Évaluation des données antérieures 29
3.2 Utilité des données sur la génotoxicité 29

Page

3.3 Essais de cancérogènes non génotoxiques 30
3.4 Relations structure-activité 30
3.5 Conclusions 31

4. Exécution du bio-essai de cancérogenèse 32
4.1 Bonnes pratiques de laboratoire 32
4.2 Conception du bio-essai 33
4.2.1 Substance chimique à tester 33
4.2.2 Choix des espèces et des souches animales 34
4.2.3 Voies d'administration de la substance chimique à tester 34
4.2.4 Choix de la dose 35
4.2.5 Nombre d'animaux à utiliser 36
4.2.6 Régime alimentaire 36
4.2.7 Évitement des biais 36
4.2.8 Durée de l'étude 37
4.2.9 Protocoles spéciaux 37
4.2.9.1 Protocoles étendus 37
4.2.9.2 Protocoles mécanistes 38
4.2.9.3 Protocoles rapides 39
4.3 Considérations pratiques 39

5. Détermination des expositions humaines 40
5.1 Rôle de l'évaluation de l'exposition 40
5.2 Principes de l'évaluation de l'exposition 41
5.3 Méthodologie de l'évaluation de l'exposition 42
5.3.1 Études de surveillance 42
5.3.1.1 Surveillance du milieu ambiant 42
5.3.1.1.1 Surveillance de l'environnement 43
5.3.1.1.2 Surveillance individuelle 43
5.3.1.2 Surveillance biologique 49
5.3.1.2.1 Dosage d'une substance chimique ou de ses métabolites dans des fluides biologiques 50
5.3.1.2.2 Mesure des effets biologiques inoffensifs 51
5.3.2 Études de modélisation 51
5.4 Quelques problèmes importants qui influent sur l'interprétation des estimations de l'exposition 52
5.4.1 Variation de l'exposition dans le temps 52
5.4.2 Extrapolation à de vastes populations 53
5.4.3 Populations à risque élevé 53
5.4.4 Assurance de la qualité 54
5.4.5 Résumé – limites globales de l'évaluation de l'exposition 54

Page

6. Interprétation et évaluation des données sur la cancérogenèse 56

6.1 Approche classique de l'évaluation des dangers que présentent les cancérogènes animaux pour les humains 57
6.1.1 Considérations générales 57
6.1.2 Dose, pharmacocinétique et métabolisme des cancérogènes qui interagissent avec l'ADN et forme de la courbe dose-réponse 58
6.1.3 Facteurs quantitatifs de l'évaluation des risques de cancérogenèse 60
6.1.3.1 Modèles mathématiques de la cancérogenèse 60
6.1.3.2 Pouvoir cancérogène 61
6.1.3.3 Évaluation du risque à faibles doses 62
6.1.3.4 Pharmacocinétique 63
6.1.3.5 Conversion d'une espèce à l'autre 63
6.2 Mécanismes de la cancérogenèse 64
6.2.1 Mécanisme de la cancérogenèse génotoxique 64
6.2.2 Aspects mécanistes de la promotion ou de l'évolution du cancer 66
6.2.3 Cancérogènes génotoxiques et non génotoxiques 67
6.3 Méthode du poids de la preuve 70
6.3.1 Tumeurs spontanées 71
6.3.2 Toxicité à fortes doses 73
6.3.2.1 Hydroxyanisole butylé 74
6.4 Conclusions 75

7. Réglementation des cancérogènes 77

8. *QUO VADIS* : L'avenir du bio-essai de cancérogenèse animale 79

9. Bibliographie 81

Liste des tableaux

Tableau 1-1. Ensemble des lois qui permettent à la Direction générale de la protection de la santé de réglementer les substances dangereuses présentes dans les aliments, les médicaments et l'environnement 16
Tableau 6-1. Classification des cancérogènes de la *U.S. Environmental Protection Agency*. 71

Résumé

En 1990, on estimait que 29 900 hommes et 24 600 femmes avaient succombé au cancer au Canada. On reconnaît aujourd'hui que les cancers sont imputables à un ou plusieurs agents appartenant à au moins quatre classes différentes : les virus, les radiations, certains agents physiques et certaines substances chimiques précises. Les agents qui augmentent le taux de formation de tumeurs malignes de façon significative dans une population sont dits cancérogènes.

Le Centre international de recherche sur le cancer en est arrivé à la conclusion que la seule façon d'accumuler des preuves suffisantes de cancérogénicité chez les humains est d'effectuer des études sur ces derniers. Les preuves épidémiologiques de cancérogénicité chez les humains proviennent de trois sources principales :

1. Les rapports de cas de groupes de patients cancéreux qui ont été exposés à des cancérogènes.

2. Les études épidémiologiques descriptives dans le cadre desquelles il a été observé que l'incidence du cancer dans les populations humaines variait selon le moment ou le lieu en fonction de l'exposition à un agent (p. ex., la relation entre le cancer de la vessie et l'emploi dans une raffinerie d'aluminium à Chicoutimi).

3. Les études épidémiologiques analytiques qui ont établi que l'exposition des personnes à un agent était associée à une augmentation du risque de cancer. Parmi celles-ci figurent les suivantes :

a. les études écologiques, ou études épidémiologiques de corrélation, qui font l'analyse de la relation entre le degré d'exposition à un ou à plusieurs facteurs et le risque d'une maladie dans divers groupes (p. ex., le rapport entre la grossesse précoce et le risque de cancer du sein);

b. les études cas-témoins, qui recueillent des informations sur l'exposition aux facteurs étiologiques potentiels après le fait, auprès de cas ainsi qu'auprès de personnes non exposées (p. ex., relation entre les cancers du vagin et les femmes dont la mère était traitée au diéthylstilbestrol);

c. les études de cohortes, qui recueillent au départ des renseignements sur le degré de diverses expositions dans une population et qui suivent cette population pendant un certain temps (p. ex., la relation entre le cancer du poumon et l'exposition aux radiations chez les mineurs de fluorine à Terre-Neuve);

d. les études d'intervention, qui répartissent au hasard des personnes ou des groupes entre les catégories «traitement» et «témoin» en vue de comparer les effets d'une intervention (p. ex., la diminution de l'apport en gras dans l'alimentation comparativement à l'absence de toute intervention) sur l'état de santé (p. ex., le risque de cancer du sein).

Plus de 40 000 substances chimiques sont utilisées en grandes quantités dans le commerce et environ 1 000 produits nouveaux ou de remplacement sont présentés sur le marché chaque année. Seulement 6 000 de ces substances chimiques ont été soumises à des tests de toxicité jusqu'à présent, bien que toutes n'aient pas fait l'objet d'une évaluation exhaustive. La plupart des substances chimiques commerciales contiennent en outre une ou probablement plusieurs impuretés biologiquement significatives. On trouve enfin dans les aliments un grand nombre de substances chimiques d'origine naturelle que l'on pourrait considérer comme d'éventuels candidats aux essais. Comme il est impossible, tant sur le plan financier que sur celui du personnel compétent disponible, d'évaluer le pouvoir d'induire le cancer qu'ont toutes ces substances chimiques et leurs impuretés, il importe au plus haut point d'établir des priorités et de tester les produits chimiques les plus importants et les plus potentiellement dangereux.

Certains groupes de substances chimiques, comme les additifs alimentaires, les pesticides et les médicaments, doivent être évalués conformément aux protocoles normalisés pour les bio-essais de cancérogenèse et pour les bio-essais combinés de cancérogenèse et de toxicité chronique, parce qu'on considère que leur usage a des effets sur la majorité de la population humaine. Quant aux autres produits chimiques à soumettre à ces tests coûteux, tout dépend du degré d'exposition auquel sont soumis les humains, des tentatives antérieures visant à démontrer leur cancérogénicité chez les humains ou les animaux, des connaissances sur leurs caractéristiques biologiques, et de la relation entre leur structure moléculaire et celle de cancérogènes connus (c.-à-d., les relations structure-activité).

Le Comité consultatif canadien sur la mutagénicité des contaminants de l'environnement a proposé une approche normalisée des tests de génotoxicité comme préambule aux bio-essais de cancérogenèse ou à d'éventuels tests de détermination de la mutagénicité des cellules reproductrices. Toutefois, quelque 40 p. 100 des cancérogènes recensés par le *U.S. National Cancer Institute/ National Toxicology Program* n'affichent aucune activité génotoxique et ne suivent pas des schémas structure-activité facilement reconnaissables comme c'est le cas d'autres cancérogènes, ce qui fait ressortir l'importance de mettre au point des essais rapides qui permettent d'évaluer ces cancérogènes non toxiques.

Le bio-essai de cancérogenèse est l'un des tests biologiques les plus complexes et les plus longs à effectuer de façon régulière. Chaque bio-essai doit être conduit conformément au *Règlement sur le code de bonne pratique de laboratoire*, ce qui a beaucoup fait pour rassurer les évaluateurs quant à l'exactitude des données recueillies dans le cadre de bio-essais de cancérogenèse, mais a aussi accru le coût des tests sur les effets toxicologiques indésirables. Plusieurs facteurs doivent être pris en considération dans la conception d'un bio-essai de cancérogenèse, dont la forme de la substance chimique à tester, l'espèce et la souche d'animal à utiliser, les voies d'administration de la substance, le choix de la dose à administrer, le nombre d'animaux à soumettre à l'étude, le régime alimentaire des animaux d'expérience, l'évitement des biais et la durée de l'étude. Par ailleurs, il arrive parfois, pour diverses raisons, que des protocoles spéciaux ou considérablement modifiés doivent être utilisés pour détecter les cancérogènes, tels que les

protocoles étendus (p. ex., le bio-essai combiné de cancérogenèse et de toxicité chronique), les protocoles mécanistes (p. ex., le protocole initiation-promotion) et les protocoles rapides (p. ex., le test de la peau de souris).

Pour estimer le risque que présente toute substance, il est nécessaire d'évaluer l'exposition. Le grand principe de base qui sous-tend l'évaluation de l'exposition est que la personne, le groupe ou la région surveillé doit être le plus représentatif possible de la population à d'étude. Il y a en gros deux types d'étude de surveillance : la surveillance du milieu ambiant et la surveillance biologique. La surveillance du milieu biologique consiste à mesurer la quantité d'une substance qui peut être absorbée et englobe la surveillance de l'environnement, couramment utilisée pour mesurer les concentrations de polluants dans un secteur donné d'une installation industrielle, et la surveillance individuelle ou dosimétrie passive, normalement effectuée sur trois voies d'exposition : cutanée, pulmonaire et orale (c.-à-d., exposition par les aliments). La surveillance biologique consiste à mesurer la concentration d'une substance chimique ou de ses métabolites dans les tissus biologiques humains, comme le sang, l'urine ou l'haleine. Le principal avantage de ce type de surveillance par rapport à la surveillance du milieu ambiant tient à ce qu'il reflète l'exposition par toutes les voies et de toutes les sources. L'interprétation des données nécessite toutefois une compréhension exhaustive de la pharmacocinétique de la substance étudiée. Des études de modélisation peuvent également être effectuées pour déterminer l'exposition, mais, comme certains de ces modèles sont extrêmement complexes et difficiles à valider, il est important de procéder à des échantillonnages pour les étayer.

Plusieurs obstacles s'opposent à l'utilisation des données recueillies dans le cadre d'évaluations de l'exposition. Par exemple, l'évaluation des risques de cancer pour les humains est souvent basée sur des données animales expérimentales obtenues en fonction de différentes périodes d'exposition et souvent, de diverses voies d'exposition; ces périodes et ces voies d'exposition peuvent différer considérablement de celles qui sont propres aux humains. De la même façon, comme la plupart des études de l'exposition professionnelle se font sur des échantillons de petite taille, leurs résultats doivent être extrapolés à une population cible importante et variable. Enfin, deux sous-ensembles particuliers de la population sont souvent négligés dans les évaluations de l'exposition et du risque : les personnes qui présentent une sensibilité excessive à un composé particulier, et celles qui sont plus exposées que d'autres (p. ex., les enfants et les travailleurs industriels).

On suppose couramment, et pas toujours à raison, qu'un agent qui s'est révélé cancérogène pour une ou plusieurs espèces animales de substitution peut l'être également pour les humains. La comparaison des effets cancérogènes de substances qui se sont révélées telles chez les animaux avec ceux auxquels on peut s'attendre chez les humains pose deux grands types de problèmes. Le premier a trait à la façon dont l'espèce et l'agent testé interagissent. Le deuxième tient au fait que les humains sont habituellement exposés à des concentrations beaucoup plus faibles de l'agent testé que ne le sont les animaux d'expérience, traités avec la dose maximum tolérée. La méthode classique d'identification et de

classification des cancérogènes humains à partir de bio-essais effectués sur des animaux prend en considération des facteurs tels que la dose, les caractéristiques pharmacocinétiques, le métabolisme des cancérogènes qui interagissent avec l'ADN et la forme de la courbe dose-réponse. Parmi les facteurs quantitatifs auxquels on peut avoir recours dans l'évaluation du risque de cancérogénèse, mentionnons les modèles mathématiques de cancérogénèse; divers indices qui servent à décrire le pouvoir des cancérogènes chimiques; l'évaluation du risque à faibles doses, qui donne une idée du degré de risque posé par de faibles degrés d'exposition; les modèles pharmacocinétiques, qui décrivent la captation, l'absorption, la distribution et l'élimination des xénobiotiques et permet ainsi d'estimer la quantité de métabolites réactifs qui atteignent le tissu cible; et l'extrapolation quantitative entre les espèces des risques cancérogènes, qui tient compte des différences connues entre les espèces.

Le processus de la cancérogénèse par agents chimiques peut être divisé en au moins deux étapes : l'initiation et la promotion. Le processus de l'initiation cancéreuse comporte la conversion de cellules apparemment normales d'un tissu en cellules qui, dans les circonstances appropriées, évoluent en cellules tumorales et en cancer proprement dit, changement qui semble être provoqué par une mutation induite ou une action génotoxique de l'agent chimique qui provoque l'initiation cancéreuse. On comprend beaucoup moins bien la manière dont les cellules deviennent cancéreuses, bien qu'il semble que plus d'un mécanisme de tumorisation ou de promotion entre en jeu dans le phénomène. Les cancérogènes génotoxiques semblent davantage capables d'induire le cancer que les cancérogènes non-génotoxiques, ce qui ne suffit certes pas pour conclure que les cancérogènes non-génotoxiques sont peu susceptibles d'avoir des effets sur les humains. D'autres tests devront être effectués pour étayer une telle conclusion.

Dans l'esprit de la méthode du poids de la preuve, les autorités chargées de la réglementation doivent rassembler toutes les données sur l'agent étudié et tenter de fonder leurs conclusions sur l'ensemble de ces données plutôt que sur un élément en particulier. Cette approche donne à l'évaluateur ou aux autorités chargées de la réglementation la souplesse dont il ont besoin pour scruter des données apparemment incohérentes et peut également se révéler utile dans le cas des faux positifs – ces produits chimiques que l'on penserait ne pas être cancérogènes pour les humains mais qui, en fait, donnent des résultats positifs dans un ou plusieurs bio-essais sur des animaux. Cela peut survenir dans certains cas quand les rendements en tumeurs sont élevés dans certains tissus particuliers chez les animaux non traités ou quand la toxicité à fortes doses spécifique à un tissu est intervenue pour accélérer le processus de cancérogénèse. Sans doute découvrira-t-on d'autres secteurs posant problème, vu l'effort de recherche intense visant à comprendre la genèse de certaines tumeurs particulières chez les rongeurs. La décision finale en matière de réglementation dépend de l'exactitude des données disponibles sur les humains et les animaux.

L'établissement de la cancérogénicité d'un composé chimique pour les animaux et l'évaluation, selon la méthode du poids de la preuve, des risques que présente le composé en question pour les humains ne constituent que les premières étapes

de la gestion d'un cancérogène chimique. L'ampleur du risque présenté par le degré d'exposition perçu ou réel auquel sont soumis les humains (évaluation du risque) doit également être évaluée comme telle, puis en fonction du cadre juridique, des facteurs économiques, de considérations sociologiques et de l'éventuelle réaction du public face aux risques perçus, avant que l'on puisse prendre une décision relativement à la réglementation nécessaire (gestion du risque).

1. Introduction

1.1 La loi et la surveillance des dangers pour la santé

La plupart des pays développés ont adopté des lois pour réglementer les agents physiques et chimiques potentiellement toxiques pour les humains. Au Canada, comme dans de nombreux autres pays, des lois distinctes ont ainsi été adoptées pour le milieu de travail, l'alimentation, les médicaments, les pesticides et l'environnement en général. Les lois canadiennes qui habilitent la Direction générale de la protection de la santé à réglementer les agents dangereux sont données au tableau 1-1.

Dans plusieurs cas, ces lois répartissent entre plusieurs organismes gouvernementaux les responsabilités liées à un domaine particulier. La *Loi sur les produits antiparasitaires*, par exemple, fait d'Agriculture Canada le principal responsable en matière d'innocuité et d'efficacité des pesticides. Par contre, c'est Santé et Bien-être social Canada qui, en vertu de la *Loi sur les aliments et drogues*, doit veiller à ce que les résidus que l'on trouve dans les cultures vivrières ne présentent pas de danger pour les consommateurs.

Quelle qu'en soit la cause, le cancer est une maladie qui suscite bien des craintes. Nous tenterons d'expliquer ici ce que signifient les termes «cancer» et «cancérogène», et de montrer de quelle façon la capacité d'une substance chimique ou d'un produit quelconque de provoquer le cancer chez les humains ou chez les animaux peut être évaluée et comment les autorités chargées de la réglementation utilisent les preuves données concernant le pouvoir cancérogène d'un produit pour élaborer les règlements destinés à protéger la santé publique.

1.2 Le cancer : la nature du problème

1.2.1 Mortalité et morbidité au Canada

Selon les estimations, 29 900 hommes et 24 600 femmes auraient succombé au cancer au Canada en 1990. En 1988, le cancer était la cause de 27 p. 100 de tous les décès. L'augmentation des taux de mortalité par cancer au cours des 20 dernières années est presque entièrement imputable au cancer du poumon. Plus de 80 p. 100 des cancers du poumon sont causés par le tabagisme. Si l'on exclut ce cancer, le taux de mortalité attribuable à l'ensemble des autres cancers a fléchi chez les femmes et n'a augmenté que légèrement chez les hommes.

Le cancer peut se développer dans pratiquement tous les tissus. Il ressort des statistiques canadiennes sur le cancer (Société canadienne du cancer, 1990) que les tissus suivants ont tous donné lieu à plus de 1 000 cancers fatals, tant chez les hommes que chez les femmes, en 1989 : poumons (17 300 cas; 14 200 décès), côlon-rectum (15 100 cas; 5 700 décès), lymphomes (5 800 cas; 2 700 décès), et

pancréas (2 750 cas; 2 700 décès). Le cancer est aussi fréquent dans les tissus associés à la reproduction sexuelle, tels que la prostate (10 300 cas; 3 300 décès) chez les hommes, et les seins (13 400 cas; 4 900 décès) et l'utérus (4 500 cas; 940 décès) chez les femmes. Nous savons qu'au moins une partie de ces cas sont attribuables au mode de vie (p. ex., le tabagisme et l'alimentation), à la profession et aux antécédents médicaux des personnes concernées ou au degré de contamination du milieu où elles vivent. Le tabagisme est la cause principale de 80 à 90 p. 100 de tous les cas de cancer du poumon chez les humains et figure également parmi les principales causes de cancer d'autres organes, tels que la vessie.

Tableau 1-1
Ensemble des lois qui permettent à la Direction générale de la protection de la santé de réglementer les substances dangereuses présentes dans les aliments, les médicaments et l'environnement

La *Loi sur le ministère de la Santé nationale et du Bien-être social*
La *Loi sur les aliments et drogues*
La *Loi sur les dispositifs émettant des radiations*
La *Loi sur les produits dangereux*
La *Loi sur le contrôle de l'énergie atomique*
La *Loi sur la lutte contre la pollution atmosphérique*
Le *Code canadien du travail*
La *Loi sur la radiodiffusion*
La *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*
La *Loi sur les produits antiparasitaires*

Le cancer est peu fréquent chez les personnes de 15 à 20 ans. À part les cancers infantiles fortement associés à l'hérédité, comme le rétinoblastome bilatéral et la leucémie reliée à la trisomie 21, les cancers voient leur fréquence augmenter à mesure que la personne avance en âge. Le cancer est par ailleurs l'une des principales causes de décès chez les enfants (0-15 ans).

1.2.2 Qu'est-ce que le cancer?

Le cancer peut être considéré comme un ensemble de maladies présentant une série de propriétés nocives communes qui s'expriment dans différents tissus. Rupert Willis (1960) a défini l'élément essentiel du cancer :

Une tumeur est une masse anormale de tissu dont la croissance trop rapide n'est pas coordonnée à celle du tissu normal et se poursuit au même rythme excessif même après la disparition des stimuli qui l'ont provoquée.

Bien que cette définition reflète le caractère biologique essentiel de la cancérogénèse, elle ne tente en aucune façon de définir l'une ou l'autre des nombreuses propriétés particulières d'une tumeur, telles que la malignité ou la bénignité.

Une tumeur est dite maligne lorsqu'elle a le pouvoir d'envahir les tissus adjacents ou d'essaimer dans des tissus éloignés, où elle forme une tumeur secondaire. Les cellules possédant ce pouvoir présentent souvent des anomalies dans leur noyau ou dans d'autres de leurs constituants, ce qui donne au médecin biologiste une autre indication sur laquelle baser son diagnostic de malignité. Bien que la croissance de la tumeur primaire puisse, entre autres (Evans, 1989), priver le reste de l'organisme d'éléments nutritifs essentiels et conduire ainsi à l'émaciation si souvent associée au cancer avancé, c'est la destruction des systèmes et appareils vitaux par l'invasion ou la croissance métastatique qui peut être fatale dans nombre de cas.

Les tumeurs bénignes, contrairement aux tumeurs malignes, ne sont pas invasives ou métastatisantes. Elles ne font que croître et peuvent comprimer les tissus qui font obstacle à leur croissance. Si elles mettent généralement moins la vie en péril que les tumeurs malignes, elles peuvent néanmoins comprimer des tissus vitaux et donc gêner certaines fonctions ou rompre des vaisseaux sanguins.

1.2.3 Cause du cancer

Puisque le cancer est si répandu et puisque c'est une maladie douloureuse et, en fin de compte, mortelle, bien des efforts ont été faits au cours du siècle pour en déterminer les causes et savoir s'il était possible de le prévenir. Nous savons aujourd'hui que certains cancers, chez les humains et chez les animaux, sont dus à un ou à plusieurs types d'agents différents, dont les quatre suivants : les virus, les radiations, certains agents physiques et certaines substances chimiques particulières.

1.2.3.1 Virus

Le rôle important joué par les virus dans la formation des tumeurs (virus oncogènes) est peut-être le mieux illustré par les leucoses aviaires qui, avant que les conditions d'hygiène soient améliorées et que des vaccins soient mis au point, faisaient périodiquement des ravages dans l'industrie avicole. Les preuves d'une origine virale du cancer chez les humains sont plus récentes et beaucoup moins abondantes. Le lymphome de Burkitt (virus EB) et certaines leucémies humaines ont une origine virale; il est d'ailleurs intéressant de noter que les virus en cause ressemblent à celui qui provoque le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Une autre découverte plus importante a été que certains groupes de tumeurs humaines et animales peuvent contenir des séquences des bases de l'ADN qui ressemblent de près à celles de certains virus oncogènes. Les tissus normaux d'où dérivent ces tumeurs contiennent également des séquences des bases de l'ADN qui peuvent être converties au type que l'on trouve dans les tumeurs par une simple mutation ponctuelle ou par la transposition de l'ADN dans un site différent du génome. Les séquences des bases de l'ADN que l'on trouve dans les tumeurs ont été nommées oncogènes; celles que l'on trouve dans

les tissus normaux ont été nommées proto-oncogènes (Klein et Klein, 1984; Barbacid, 1986; Ramel, 1986). L'inhibition des gènes suppresseurs qui contrôlent l'expression des oncogènes a été analysée par Klein (1987).

1.2.3.2 Radiations et radioisotopes

Une forte exposition aux radiations ionisantes (à haute) s'est révélée dangereuse. Les exemples sont nombreux de personnes qui ont contracté le cancer par suite d'une exposition à ces radiations, à cause de l'explosion d'une bombe atomique, de leur travail dans les mines d'uranium ou dans toute autre mine où la teneur ambiante en radon est élevée (voir chapitre 2), et de l'utilisation médicale de rayons X et de radioisotopes.

La lumière ultraviolette est une composante naturelle de la lumière du soleil. Comme elle possède une énergie plus faible que les rayonnements ionisants, elle ne pénètre pas les tissus corporels. On a toutefois déterminé qu'il s'agissait d'une cause importante du cancer de la peau chez les humains. Le rayonnement ultraviolet provoque principalement un épithélioma cutané basocellulaire qu'il est souvent facile d'éliminer par une intervention chirurgicale mineure; c'est d'ailleurs pourquoi le nombre de cas n'est pas bien connu, tous n'étant pas déclarés. Le rayonnement ultraviolet provoque aussi l'épithélioma malpighien spino-cellulaire de la peau et des mélanomes malins, qui comptent parmi les tumeurs humaines les plus mortelles. À l'heure atuelle, la fréquence de ces tumeurs est à la hausse. Chez un petit nombre de personnes atteintes d'une maladie génétique appelée xeroderma pigmentosum, l'organisme est incapable de réparer l'ADN lorsque celui-ci est endommagé par le rayonnement ultraviolet. Ces personnes sont par conséquent beaucoup plus sensibles aux effets néfastes de ce type de rayonnement et contractent beaucoup plus souvent des cancers de la peau à cause de l'exposition au soleil que l'ensemble de la population.

1.2.3.3 Agents physiques

L'implantation, dans les tissus sous-cutanés de rongeurs, de toutes sortes de matériaux, dont des métaux, des plastiques, du verre ou des produits naturels, provoque, après une longue période de latence, l'apparition de sarcomes. Il semble qu'aucune tumeur de ce genre n'ait jamais été signalée chez les humains porteurs de prothèses implantées chirurgicalement.

L'amiante pourrait être considéré comme un cancérogène physique. En effet, l'inhalation de fibres d'amiante dont la taille et la forme leur permettent de pénétrer dans les plus petites ramifictions des voies respiratoires est suivie, de nombreuses années plus tard, par l'apparition de mésothéliomes (cancers des séreuses) de la plèvre et du péritoine, de même que du cancer du poumon chez les humains (et d'une gamme semblable de tumeurs chez les animaux traités avec de l'amiante). Une incidence élevée de ces cancers a été observée chez les

travailleurs du textile d'amiante, chez ceux qui manipulent les isolants dans les navires et chez ceux qui travaillent dans une variété d'autres circonstances où de l'amiante est utilisée (Selikoff et Lee, 1978).

1.2.3.4 Agents chimiques

On a montré que plusieurs centaines de substances chimiques causaient le cancer chez les animaux de laboratoire (CIRC, 1987); dans certains cas, on sait que les mêmes substances peuvent également provoquer le cancer chez les humains. L'histoire des premiers développements de la cancérogénèse par agents chimiques a été relatée nombre de fois (Clayson, 1962; Clayson et Krewski, 1990) et nous ne la reprendrons pas ici. Au cours des 40 dernières années, une grande partie de l'effort de recherche a été consacrée à trouver pourquoi et comment certaines substances chimiques provoquaient le cancer, et à déterminer si les espèces animales de substitution utilisées en laboratoire étaient toujours de bons prédicteurs de maladies chez les humains. Il semble aujourd'hui que, pour que la reconnaissance des cancérogènes et leur extrapolation aux humains soient valables, il soit essentiel de mieux comprendre les processus cancérogènes.

1.3 Définitions

De nombreux scientifiques ont tenté de définir le terme «cancérogène». Chacune des définitions élaborées est opérationnelle – c'est-à-dire qu'elle ne se fonde que sur une ou plusieurs observations individuelles sans tenter de comprendre les grands processus de base qui entrent en jeu. Dans le présent texte, nous utiliserons la définition suivante (Clayson, 1987) :

Un cancérogène est un agent qui augmente de façon significative le taux de formation de tumeurs malignes ou, dans certaines circonstances, de tumeurs bénignes et malignes, dans une population. Le changement dans le taux de formation de tumeurs peut se manifester par une augmentation du nombre des tumeurs, une diminution de leur latence ou en une combinaison de ces deux facteurs.

La question de savoir quand il convient ou non de combiner tumeurs bénignes et tumeurs malignes est complexe et demande que l'on tienne compte de facteurs pathologiques dans la procédure de bio-essai.

Une foule de travaux, à commencer par ceux de Rous et Kidd (1941) et de Berenblum et Shubik (1947a, 1947b, 1949), ont montré que, dans de nombreux tissus (Pitot et Sirica, 1980; Weinstein, 1985), la cancérogénèse pouvait être divisée en au moins deux étapes distinctes (voir sections 4.2.9.2 et 6.2). Les deux premières étapes à avoir été déterminées avec certitude ont été appelées l'«initiation» et la «promotion» et ont été définies comme suit :

L'initiation est un processus relativement rapide et apparemment irréversible par lequel les cellules du tissu affecté acquièrent, dans certaines conditions, la capacité d'évoluer en tumeurs.

La promotion est une phase plus lente dans laquelle l'administration répétée d'un non-cancérogène donne lieu à l'apparition de tumeurs dans un tissu préalablement initié.

Bien que tout cancérogène complet puisse avoir une action de promotion, la définition stricte du terme «promotion» exige de l'agent qu'il ne provoque pas par lui-même un nombre élevé de tumeurs.

Un troisième phénomène global de la cancérogénèse a été étudié par Foulds (1969) à partir de ses observations cliniques et expérimentales personnelles :

La «progression» consiste en l'augmentation graduelle et irréversible de la malignité d'une tumeur.

2. Épidémiologie

2.1 Rôle de l'épidémiologie

Comme l'écrivait le poète Alexander Pope : «Pour bien étudier le genre humain il faut prendre l'homme pour sujet (traduction).» L'épidémiologie étudie l'occurrence et les causes de la maladie humaine. Son objectif est de fournir des informations qui aident à prévenir ou à réduire les problèmes sanitaires dans les populations humaines. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) en est arrivé à la conclusion que la seule façon de recueillir des données satisfaisantes sur la cancérogénicité chez les humains est de procéder à des études sur ces derniers. Nous décrivons dans ce chapitre les types d'enquêtes épidémiologiques qui servent à déterminer les risques de cancer directement chez les humains, et nous donnons des exemples d'études effectuées par Santé et Bien-être social Canada.

Le CIRC (1987) a remarqué que les preuves épidémiologiques de cancérogénicité chez les humains provenaient de trois grandes sources :

1. Les rapports de cas de groupes de patients cancéreux qui ont été exposés à des cancérogènes.

2. Les études épidémiologiques descriptives dans le cadre lesquelles il a été observé que l'incidence du cancer dans les populations humaines variait selon le moment ou le lieu en fonction de l'exposition à un agent.

3. Les études épidémiologiques analytiques qui ont établi que l'exposition des personnes à un agent était associée à une augmentation du risque de cancer.

2.2 Principes d'épidémiologie

Le CIRC (1987) a fixé trois critères à respecter avant que l'on puisse inférer une association causale entre une exposition et le cancer chez les humains :

1. Aucun biais repérable ne doit pouvoir expliquer l'association.

2. La présence de facteurs de confusion a été prise en considération et rejetée à titre d'explication de l'association.

3. Il est peu probable que l'association soit due au hasard.

En général, bien qu'une étude unique puisse faire ressortir un rapport de cause à effet, le niveau de confiance d'une association causale inférée est accru (i) lorsque plusieurs études indépendantes concordent pour montrer qu'il y a association, (ii) lorsque l'association est puissante, (iii) lorsqu'il existe une relation dose-réponse, (iv) lorsqu'une diminution de l'exposition est suivie par une diminution de l'incidence du cancer, (v) lorsque l'exposition précède clairement

le développement du cancer, et (vi) lorsqu'il existe des preuves à l'appui chez les animaux ou *in vitro*. Les niveaux de preuves de la cancérogénicité chez les humains ont été classés par le CIRC (1987) comme suit : preuve suffisante, preuve limitée, preuve insuffisante, et preuve suggérant une absence de cancérogénicité.

2.3 Rapports de cas

Certains rapports de cas laissent croire à l'existence d'associations avec certaines expositions précises. Souvent, ces rapports ont été le premier indice d'un lien causal possible entre un cancer et une exposition à une substance chimique (p. ex. la suie). Certains d'entre eux fournissent également des preuves de cancérogénicité, lorsque des études animales ont donné des résultats positifs, mais sans avoir été soumises à une appréciation (p. ex., le chlorure de vinyle). Des rapports de cas ont également permis d'identifier plusieurs procédés industriels qui causent le cancer chez les humains (p. ex., la fabrication du magenta), mais sont difficiles à confirmer à l'aide de tests de cancérogénicité animale. Les rapports ne fournissent cependant aucune donnée concluante sur la cancérogénicité.

2.4 Épidémiologie descriptive

L'épidémiologie descriptive est l'étude de la distribution d'une maladie dans une population, un lieu et une période donnés. Ces études servent à déterminer les sous-groupes à élevé risque définis par divers paramètres tels que le sexe, l'âge, la profession, l'emplacement géographique, le niveau d'instruction et le revenu. Les études descriptives jouent un rôle essentiel dans la formulation d'hypothèses sur les causes des maladies, et dans l'évaluation de l'état de santé des populations et de l'incidence des programmes de lutte contre la maladie.

2.4.1 Cancer de la vessie chez les travailleurs des raffineries d'aluminium

Grâce à la surveillance des données sur l'incidence du cancer au Canada, le Laboratoire de lutte contre la maladie a décelé un taux très élevé du cancer de la vessie dans la région de Chicoutimi au Québec (Wigle, 1977a). En effet, 81 nouveaux cas de cancer de la vessie ont été signalés entre 1969 et 1973, alors qu'il n'aurait dû y en avoir que 51 d'après les taux d'incidence du Québec. Le rapport entre le nombre de cas chez les hommes et chez les femmes, qui atteignait presque 11:1, était beaucoup plus élevé que la moyenne nationale de 4:1. Comme les écarts les plus importants en termes relatifs et absolus dans les cas de cancer de la vessie ont été observés chez les hommes âgés de 45 à 64 ans, on en a déduit que des expositions professionnelles pourraient être à l'origine de la maladie.

L'industrie de l'aluminium de la région de Chicoutimi employait 54 p. 100 des hommes dans le secteur de la fabrication. Elle se servait surtout du procédé Soderberg, qui utilise des anodes fabriquées à partir d'un mélange de coke et de braie de houille. Lorsqu'il est chauffé, le braie de goudron de houille produit des amines aromatiques (Clayson, 1976). Cette classe de produits chimiques est associée au cancer de la vessie chez les humains. On a signalé que ces anodes, chauffées aux températures élevées nécessaires au procédé de raffinement, libéraient des hydrocarbures volatiles, notamment du benzo(a)pyrène (Livingstone, 1953, cité dans Konstantinov et Kuz'minykh, 1971). Une étude de la mortalité chez les couvreurs, également exposés au benzo(a)pyrène et à d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques, a aussi fait ressortir que les travailleurs exposés pendant au moins 20 ans couraient des risques élevés de cancer de la vessie et du poumon (Hammond et coll. 1976).

Une étude cas-témoins du cancer de la vessie (Thériault et coll., 1981) a révélé une association entre l'augmentation des risques de cancer de la vessie et le travail dans la section de l'électrolyse d'une usine de raffinage de l'aluminium à Chicoutimi. La compagnie, devant ce résultat, a remplacé les électrodes par d'autres, différentes et «plus sûres», amélioré la ventilation des locaux, exigé le port de masques protecteurs et mis en place un programme de dépistage précoce du cancer de la vessie par cytologie urinaire.

2.5 Études écologiques

Les études écologiques, ou études épidémiologiques de corrélation, font l'analyse statistique de la relation entre le degré d'exposition à un ou plusieurs facteurs et le risque d'une maladie dans un groupe, comme une collectivité ou une région géographique, plutôt que chez des individus. La découverte d'une association entre l'exposition et la maladie est alors considérée comme l'indice d'un effet causal possible. Les études écologiques ne permettent pas de tenir suffisamment compte d'éventuels facteurs de confusion, tels que l'emploi, l'alimentation et le mode de vie; leurs résultats servent avant tout à déterminer si d'autres études épidémiologiques analytiques plus rigoureuses s'imposent.

2.5.1 Cancer du sein et tendances de la fertilité

Le taux de mortalité attribuable au cancer du sein chez les Canadiennes de 30 à 69 ans était inversement corrélé à la proportion, par province, de femmes mariées pour la première fois à l'âge de 15 à 19 ans (Wigle, 1977b). De surcroît, la mortalité attribuable à ce cancer et son taux d'incidence chez les femmes de 40 à 59 ans étaient significativement et négativement corrélés au taux de fécondité de ces femmes entre 20 et 24 ans. Ces données viennent étayer celles d'autres études indiquant qu'une grossesse précoce protège contre le cancer du sein. La brusque chute du taux de fécondité depuis 1960, de même que le report de la première grossesse pourraient donc entraîner une augmentation de l'incidence du cancer du sein dans l'avenir.

2.5.2 Variation du risque de décès attribuable au cancer en fonction du revenu

Le risque de décès attribuable au cancer a été analysé pour les Canadiens qui appartiennent à cinq catégories établies en fonction du revenu moyen par ménage (Wigle et Mao, 1980). Chez des adultes de 35 à 64 ans, les personnes qui appartiennent à la catégorie du revenu le plus faible présentaient des risques considérablement plus élevés que celles qui appartiennent à la catégorie du revenu le plus élevé en ce qui concerne les cancers de la bouche et du pharynx, de l'oesophage, de l'estomac, du côlon (hommes), du larynx (hommes), du poumon (hommes), du col utérin (femmes), et du corps de l'utérus (femmes).

Ces variations reflètent le fait que les personnes qui appartiennent à la catégorie du revenu le plus faible sont davantage susceptibles d'être exposées aux facteurs de risque connus de ces cancers (p. ex., le tabac, l'alcool, la mauvaise alimentation, les cancérogènes professionnels, les partenaires sexuels multiples, l'obésité). Dans la catégorie du revenu le plus élevé, le seul cancer à risque élevé était le cancer des ovaires, ce qui peut s'expliquer en partie par le fait que les femmes qui appartiennent à la catégorie du revenu le plus faible ont eu en général des grossesses antérieures et sont donc mieux protégées contre ce cancer.

2.6 Études cas-témoins

Ces études recueillent des informations sur l'exposition aux facteurs étiologiques potentiels après le fait, auprès de cas ainsi qu'auprès de personnes non exposées (témoins). Du fait de l'échantillonnage des sujets malades et des méthodes utilisées pour recueillir rétrospectivement les renseignements sur l'exposition, ce genre d'étude convient bien à la vérification des hypothèses étiologiques formulées pour des maladies relativement rares.

Il est parfois difficile d'obtenir des informations fiables sur les expositions (p. ex., l'utilisation de médicaments de prescription et les habitudes alimentaires), notamment lorsqu'il faut remonter vingt ans ou plus en arrière, comme c'est le cas pour certaines maladies, dont le cancer. Les études cas-témoins n'en ont pas moins permis de cerner de nombreux dangers, tels que les risques de cancer du vagin chez les jeunes femmes dont la mère s'était vue prescrire l'hormone de synthèse diéthylstilbestrol (DES) pour réduire le risque de fausse-couche (Herbst et coll., 1971). Les mères des cas étaient plus susceptibles d'avoir fait des fausses-couches antérieures ou d'avoir souffert d'hémorragie pendant la grossesse en question : c'est pourquoi l'utilisation de DES était indiquée. La principale différence entre les mères des cas et les mères des témoins était l'exposition au DES pendant la grossesse considérée; 7 mères de cas sur 8 avaient été exposées, comparativement à 0 sur 32 pour les témoins. Cette association a été confirmée par la suite par des études épidémiologiques plus vastes.

2.7 Études de cohortes

Dans les études de cohortes, on recueille au départ des renseignements sur la présence et le degré de diverses expositions dans une population (habituellement choisie parmi des personnes exemptes de maladie, du moins de la maladie étudiée), puis on suit cette population pendant un certain temps. La durée du suivi nécessaire est fonction de la taille de la cohorte, du taux d'incidence de base de la ou des maladies à l'étude, de la limite de détection du risque relatif désirée, et de la période de latence moyenne entre la première exposition et l'apparition de la maladie. Les dossiers sur les expositions antérieures (p. ex., les antécédents d'exposition professionnelle) sont souvent utilisés, car ils offrent le précieux avantage de réduire le temps nécessaire au suivi. L'état de santé est habituellement établi au moyen de recherches dans les dossiers médicaux, tels que les certificats de décès, les registres de cancer et les données sur les admissions à l'hôpital. L'échantillonnage direct des sujets soumis à des expositions variables, couplé à un plan visant à enregistrer les effets sur la santé à mesure qu'ils se produisent, convient bien à l'étude de maladies relativement courantes, telles que les coronaropathies, les blessures causées par des accidents de la route, les infections courantes ou les décès dus à toutes les causes combinées.

Dans les études sur le cancer, la période de suivi peut s'étendre sur plusieurs décennies, à moins que l'on ne recrute de vastes populations. Des milliers d'années-personnes d'observation sont nécessaires pour l'étude de maladies relativement rares. Les études de cohortes ont démontré que le tabagisme double le taux global de mortalité; plus récemment, elles ont permis d'établir qu'il y avait une augmentation de la mortalité attribuable au cancer du poumon chez les fumeurs passifs.

2.7.1 Cancer du poumon induit par les radiations chez les mineurs de fluorine à Terre-Neuve

L'extraction de la fluorine à St. Lawrence, Terre-Neuve, a commencé en 1936 et s'est poursuivie jusqu'en 1978. Au début des années 1950, l'augmentation des décès attribuables au cancer du poumon parmi les mineurs a mis la puce à l'oreille aux autorités sanitaires. En 1960, Santé et Bien-être social Canada a effectué des mesures qui ont révélé la présence de fortes concentrations de radon et de ses produits de filiation dans l'air de la mine. Les teneurs atteignaient en effet parfois une valeur de 190 «niveaux de travail» (par opposition à la norme actuelle de 0,3). Des essais ont révélé qu'il y avait du radon dans les énormes quantités d'eau qui suintaient dans la mine, provenant présumément de gisements d'uranium naturel. En 1960, la compagnie a installé un système de ventilation mécanique dans les mines, et les concentrations de descendants du radon dans l'air ont chuté à des valeurs bien en-deçà des normes admissibles de l'époque.

Dernièrement, Santé et Bien-être social Canada a poursuivi l'étude de ces mineurs (Morrisson et coll., 1988). La cohorte étudiée comprenait 1 772 mineurs de fond et 352 mineurs de surface employés par l'une des deux compagnies

minières locales entre 1933 et 1978. Les antécédents professionnels de ces mineurs ont été déterminés, de même que leurs habitudes de consommation de tabac. Au total, 445 décès ont été enregistrés parmi les mineurs de fond entre 1950 et 1984. Parmi ceux-ci, 185 ont été attribués au cancer, dont 113 à des cancers du poumon. Le nombre observé de cancers du poumon, des glandes salivaires et de la cavité buccale et du pharynx était significativement élevé. Le nombre de décès attribuables à une bronchopneumopathie chronique obstructive et à des chutes accidentelles était également élevé, mais non de façon significative. Le risque de cancer du poumon augmentait en fonction de l'augmentation de la dose cumulative de radiations. Chez les hommes qui appartiennent à la catégorie la plus exposée, ce risque était plus de 30 fois supérieur à celui de l'ensemble de la population mâle de la province. La relation entre l'exposition et le risque était puissante et significative sur le plan statistique.

2.8 Études d'intervention

Dans les études d'intervention, on répartit au hasard des personnes ou des groupes entre les catégories «traitement» et «témoin» afin de comparer les effets d'une intervention (p. ex., la diminution de l'apport en gras dans l'alimentation comparativement à l'absence de toute intervention) sur l'état de santé (p. ex., le risque de cancer du sein). L'*Étude nationale sur le dépistage du cancer du sein*, qui a coûté près de 20 millions de dollars sur une période de 10 ans, portait sur 90 000 Canadiennes âgées de 40 à 59 ans. Cette étude avait deux grands objectifs : (i) évaluer l'effet que peuvent avoir l'examen médical et la mammographie sur le risque d'être atteint d'un cancer du sein fatal, comparativement à l'absence d'intervention, chez les femmes de 40 à 49 ans, et (ii) évaluer l'effet que peuvent avoir l'examen médical et la mammographie sur le risque d'être atteint d'un cancer du sein fatal, comparativement à l'examen médical seul, chez les femmes de 50 à 59 ans. En effet, si elles s'avéraient efficaces, ces interventions pourraient être pratiquées de façon systématique pour réduire la morbidité et la mortalité prématurée dans le cadre d'un programme de dépistage et de traitement précoces du cancer du sein.

2.9 Interprétation des études épidémiologiques

La puissance des études épidémiologiques peut être évaluée en fonction d'un certain nombre de facteurs, que l'on peut illustrer en prenant en considération les effets du tabagisme «passif» – c'est-à-dire les répercussions sur les non-fumeurs du fait de vivre dans un milieu contaminé par la fumée de cigarette (Wigle et coll., 1987).

Si la *puissance de l'association* entre le tabagisme passif et le cancer du poumon n'est en aucune façon aussi élevée que dans le cas des fumeurs actifs, elle n'en est pas moins raisonnablement *constante* en ce qui concerne le degré de risque démontré par une série d'études, notamment pour les femmes non-fumeuses dont les conjoints sont de gros fumeurs. De la même façon, la *temporalité*, ou la démonstration d'une augmentation du risque en fonction de la durée de

l'exposition aux agents nocifs, est une notion importante, et elle a été démontrée dans le cas des fumeurs passifs. On a montré aussi que l'augmentation de l'exposition involontaire à la fumée de cigarette (*gradient biologique*) accroissait le risque de cancer du poumon.

La *plausibilité biologique* de l'association est étayée par le fait que la fumée de cigarette expirée par les fumeurs contient de nombreux cancérogènes connus, dont certains n'ont pas été détectés dans la fumée inhalée par les fumeurs actifs. De surcroît, l'*analogie* entre les effets du tabagisme passif et du tabagisme actif renforce considérablement le niveau de confiance que l'on peut attribuer à la validité d'une association entre le tabagisme passif et le cancer du poumon. Des considérations semblables à celles dont il est fait état ici servent à l'évaluation de la plupart des séries d'études épidémiologique.

3. Choix des substances chimiques à soumettre aux bio-essais de cancérogénèse

On estime à 70 000 le nombre de substances chimiques produites et utilisées commercialement, dont plus de 40 000 sont utilisées en grande quantité dans le commerce. Chaque année, environ 1 000 produits nouveaux ou de remplacement sont présentés sur le marché. Environ 6 000 de ces substances chimiques ont été soumises à des tests de toxicité jusqu'à présent, bien que toutes n'aient pas fait l'objet d'une évaluation exhaustive. La plupart des substances chimiques commerciales contiennent en outre une, ou probablement plusieurs impuretés biologiquement significatives. On trouve enfin dans les aliments un grand nombre de substances chimiques d'origine naturelle que l'on pourrait considérer comme d'éventuels candidats aux essais.

Il est impossible d'évaluer le pouvoir d'induire le cancer qu'ont toutes ces substances chimiques et leurs impuretés. Un unique bio-essai portant sur une seule substance chimique est extrêmement coûteux sur le plan financier – 2,5 millions de dollars pour chaque substance – et difficile à exécuter étant donné la pénurie de personnel compétent et d'installations adéquates. À l'heure actuelle, à l'échelle mondiale, il semble qu'on ne puisse évaluer le pouvoir cancérigène que de 150 à 200 produits par année tout au plus. Et il est peu probable que la situation change, même si l'on injecte des sommes considérables dans ce secteur, vu le manque de personnel compétent. Il est donc de la plus haute importance que les promoteurs de produits et les autorités chargées de la réglementation établissent des priorités et testent les produits chimiques les plus importants et les plus potentiellement dangereux.

Nous nous pencherons dans ce chapitre sur certaines des considération non mécanistes qui peuvent aider au choix des substances à soumettre à des bio-essais de cancérogénèse.

Certains groupes de substances chimiques, comme les additifs alimentaires, les pesticides et les médicaments, doivent être évalués conformément aux protocoles normalisés pour les bio-essais de cancérogénèse ou pour les bio-essais combinés de cancérogénèse et de toxicité chronique. Les protocoles décrits dans les «Lignes directrices pour les essais de produits chimiques» de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 1984) conviennent habituellement à cette fin. Le code de bonnes pratiques de laboratoire de l'OCDE doit également être utilisé (OCDE, 1982; Santé et Bien-être social Canada, 1990).

On traite ainsi les médicaments, les pesticides et les additifs alimentaires parce qu'on estime que leur usage a des effets sur la majorité de la population humaine. Quant aux autres produits chimiques à soumettre à ces tests coûteux, tout dépend du degré d'exposition auquel sont soumis les humains, des tentatives antérieures

visant à démontrer leur cancérogénicité chez les humains ou les animaux, des connaissances sur leurs caractéristiques biologiques, et de la relation de leur structure moléculaire avec celle de cancérogènes connus. Bien qu'il soit possible de relier grossièrement l'exposition des humains à la production, cela ne peut en aucune façon remplacer l'évaluation détaillée des expositions réelles ou perçues découlant des divers modes d'utilisation de la substance en question (voir chapitre 5). Cette évaluation est essentielle tant pour la décision de tester ou pas le produit en question eu égard à son pouvoir cancérogène que pour la décision de réglementer le produit lorsqu'il s'avère qu'il provoque le cancer chez les rongeurs.

3.1 Évaluation des données antérieures

Les normes et l'exhaustivité des bio-essais de cancérogénèse ont été améliorées ces dernières années. L'adoption de codes de bonnes pratiques de laboratoire (*U.S. Food and Drug Administration*, 1976; OCDE, 1982; *U.S. Environmental Protection Agency*, 1983a, 1983b) a permis aux autorités scientifiques chargées de la réglementation de reconstruire l'ensemble du processus d'une expérience à partir de la filière documentaire contrôlée établie au moment où l'expérience a été effectuée. Les normes régissant l'entretien des animaux ont aussi été resserrées depuis les 30 dernières années, et les animaux sont en meilleure santé et vivent souvent plus longtemps.

3.2 Utilité des données sur la génotoxicité

Le Comité consultatif canadien sur la mutagénicité des contaminants de l'environnement (1986) a proposé une approche normalisée des tests de génotoxicité comme préambule aux bio-essais de cancérogénèse ou à d'éventuels tests de détermination de la mutagénicité des cellules reproductrices. Cette approche est fondée sur des «niveaux de préoccupation» et se veut une exigence minimale. Ainsi, tous les produits chimiques doivent être étudiés à l'aide d'un essai de mutagénicité *in vitro*, tel que le test Ames pour les *salmonella-microsomes*, et d'un essai cellulaire mammalien *in vitro* pour les aberrations chromosomiques. Pour les produits chimiques jugés moins préoccupants, ces deux essais devraient suffire si les résultats sont négatifs. Pour les produits plus préoccupants et, éventuellement, pour ceux qui le sont moins, mais qui ont donné des résultats positifs au cours des essais *in vitro*, au moins un test d'aberration chromosomique *in vivo* sera exigé. Si cet essai *in vivo* est positif, la substance sera un candidat prioritaire à un bio-essai de cancérogénèse; par contre, s'il est négatif, il ne serait alors probablement pas nécessaire de faire subir au produit un bio-essai de génotoxicité, même si les essais *in vitro* ont été positifs.

Le raisonnement scientifique qui justifie de mettre l'accent sur les essais *in vivo* repose sur le fait que les méthodes d'essai de génétoxicité *in vitro* ont tendance à déformer un certain nombre des processus qui conduisent à des résultats positifs, ce qui rend ces essais très sensibles et en fait en même temps des prédicteurs relativement inadéquats des résultats des bio-essais de cancérogénèse chez des animaux vivants (Douglas et coll. 1988). Cette sensibilité semble d'ailleurs rendre

compte de certaines corrélations relativement insatisfaisantes signalées dans la comparaison des essais de génétoxicité *in vitro* et des bio-essais de cancérogénèse (Ashby et Tennant, 1988).

3.3 Essais de cancérogènes non génotoxiques

Quelque 40 p. 100 des cancérogènes recensés par le *U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program* (NCI/NTP) n'affichent aucune activité génotoxique (Ashby et Tennant, 1988) et ne suivent pas des schémas structure-activité facilement reconnaissables comme c'est le cas d'autres cancérogènes. Ces substances chimiques ne peuvent par conséquent pas être reconnues à l'aide des essais courants de génétoxicité. Pourtant, certaines d'entre elles, comme l'amiante, sont cancérogènes pour les humains. Il importe donc de mettre au point des essais rapides qui permettent d'évaluer ces cancérogènes non génotoxiques.

Aucun test établi et validé n'a encore été mis au point pour ces composés. Il se pourrait que certains d'entre eux soient des agents promoteurs qui agissent sur les cellules déjà initiées d'une façon ou d'une autre chez l'animal testé. Il existe cependant un test qui permet de reconnaître certains de ces agents promoteurs du cancer. Ce test est connu sous le nom d'essai de collaboration de cellule à cellule (Yotti et coll., 1979) et fait appel à cette capacité qu'ont les cellules qui croissent en culture de collaborer les unes avec les autres pour répondre à leurs besoins communs. L'addition d'un agent promoteur fait obstacle à cette collaboration et réduit ainsi la capacité de certaines cellules de supporter les effets de certains agents toxiques particuliers. Cette susceptibilité peut être reconnue et évaluée à l'apparence des cellules.

Par ailleurs, l'examen attentif des changements survenus dans l'étude subchronique *in vivo* précédant le bio-essai de cancérogénèse comme tel fournit parfois certains renseignements sur les produits chimiques susceptibles d'être des cancérogènes non génétoxiques. L'hydroxyanisole butylé, par exemple, a constamment provoqué un nombre élevé de réactions prolifératives et inflammatoires dans la partie du pré-estomac où des tumeurs ont fini par apparaître. Des scientifiques ont proposé de se servir de cette notion de l'induction par l'agent chimique d'une forte prolifération cellulaire comme phénomène déclencheur de la cancérisation pour reconnaître certains cancérogènes non génotoxiques (Clayson et coll., 1986; Clayson, 1987).

3.4 Relations structure-activité

Les relations structure-activité (RSA) sont couramment employées en pharmacologie et en toxicologie pour déterminer les structures chimiques capables d'exécuter certaines fonctions. Comme la cancérogénèse est un processus en plusieurs étapes, les RSA y sont souvent plus compliquées que dans d'autres processus plus simples – p. ex., l'inhibition de certaines enzymes spécifiques, telles que l'acétylcholinestérase, par certains pesticides. Certaines

structures chimiques sont souvent, mais non systématiquement, associées à l'activité cancérogène. Mentionnons, par exemple, les composés comme les hydrocarbures aromatique polycycliques, les amines aromatiques et les composés connexes, les dérivés N-nitroso et les agents biologiques alkylants et arylants.

Bien que certaines RSA soient des plus utiles dans l'industrie pharmaceutique pour dériver de nouveaux produits efficaces contre certaines cibles précises, ce n'est pas toujours le cas avec les cancérogènes. Un cancérogène peut en effet induire un cancer par des mécanismes différents dans des tissus différents d'une même espèce. Les autorités de réglementation doivent donc faire preuve de prudence lorsqu'elles ont recours aux RSA. Celles-ci sont surtout utiles lorsque le produit chimique examiné contient un ou plusieurs des groupes-clés associés à l'induction du cancer. Dans ce cas, en effet, la cancérogénicité ou la non-cancérogénicité connue d'autres composés qui lui sont structurellement reliés peut suffire à donner une indication du pouvoir cancérogène, probable ou non, du produit en question (Enslien, 1987). Les approches récentes qui font appel à l'intelligence artificielle et à l'informatique pour découvrir les sous-structures critiques des molécules cancérogènes s'avèrent à ce chapitre des plus prometteuses (Rosenkranz et Klopman, 1990).

3.5 Conclusions

De façon générale, les produits chimiques nouveaux sur le marché feront l'objet d'un examen plus serré que ceux que l'on trouve déjà dans l'environnement humain depuis un certain temps, et cela parce que la présence d'un agent dans l'environnement signifie que les humains y ont déjà été exposés et que tout nouveau produit peut augmenter le degré de risque humain à moins qu'il y ait suffisamment de données indiquant le contraire.

4. Exécution du bio-essai de cancérogénèse

Le bio-essai de cancérogénèse est l'un des tests toxicologiques les plus complexes et les plus longs à effectuer de façon régulière.

4.1 Bonnes pratiques de laboratoire

En 1976, la *U.S. Food and Drug Administration* adoptait un code de bonnes pratiques de laboratoire (*Code of Good Laboratory Practice Regulations*), comme le firent par la suite d'autres organismes nationaux et internationaux (OCDE, 1982; *U.S. Environmental Protection Agency*, 1983a, 1983b). C'est pourquoi toute étude non clinique effectuée à l'appui d'une demande d'homologation doit aujourd'hui être conforme au *Règlement sur le code de bonnes pratiques de laboratoire* pour être acceptée par les autorités d'homologation aux États-Unis et dans de nombreux autres pays.

C'est le directeur de l'étude qui est responsable de la préparation du plan d'étude qui doit être soumis à l'approbation de l'Administration, de l'exécution de l'étude comme telle et de l'évaluation initiale des données obtenues. L'Administration doit de son côté mettre à la disposition du directeur de l'étude le personnel, les installations et les ressources dont il a besoin pour la réalisation de l'étude et l'interprétation de ses résultats.

Un protocole détaillé doit être préparé, précisant notamment l'objectif de l'étude et la façon dont il sera atteint, et donnant la liste de tous les employés et de leurs qualités. Les diverses composantes du protocole doivent servir de modes opératoires normalisés (MON). Un MON est exigé pour chaque procédure de l'étude, telle que le lavage des cages; le maintien de la température et de l'humidité et le réglage de l'illumination dans les quartiers des animaux; le pesage des animaux; l'exécution des procédures d'analyse; la préparation des lamelles; et l'exécution des évaluations pathologiques des tissus obtenus dans le cadre de l'étude. Toute étude conforme aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) est soumise à deux types de surveillance : (i) une surveillance exercée par un groupe interne nommé par l'Administration, et (ii) une surveillance exercée par une équipe de vérification externe nommée par l'État. L'adhésion aux BPL est encore volontaire au Canada à l'heure actuelle; la Direction générale de la protection de la Santé s'assure toutefois que, dans la mesure du possible, ses études sont effectuées conformément aux protocoles des BPL.

L'utilisation de plus en plus courante de l'ordinateur pour la collecte, le stockage, l'extraction et l'analyse des données expérimentales obtenues dans le cadre d'études toxicologiques et autres a donné lieu à de récents développements en matière de BPL. La technologie informatique est en effet fort utile dans les études complexes comme les bio-essais de cancérogénèse, qui peuvent produire plusieurs millions d'éléments d'information individuels. Les programmes

informatiques utilisés doivent cependant être validés; on aura ainsi l'assurance qu'ils exécutent bien les fonctions pour lesquelles ils sont prévus et ne perdent pas ou ne modifient pas accidentellement les données brutes.

L'adoption des BPL a beaucoup fait pour rassurer les évaluateurs quant à l'exactitude des données provenant d'études comme les bio-essais de cancérogenèse. Par contre, les coûts d'exécution des tests de détermination des effets toxicologiques ont augmenté.

4.2 Conception du bio-essai

4.2.1 Substance chimique à tester

Lorsqu'on effectue les bio-essais servant à la réglementation, on utilise habituellement le produit auquel la population est exposée. Ainsi, pour les additifs alimentaires, on se sert de composés chimiques de qualité alimentaire; dans le cas des pesticides, on se sert habituellement de produits de qualité technique représentatifs de la substance utilisée dans le milieu. Comme ces produits ne sont pas toujours chimiquement purs, il est d'abord nécessaire de bien les caractériser avant de les étudier. Il importe de déterminer la nature et la concentration des impuretés du produit à tester de façon à s'assurer qu'il ne contient pas de concentrations biologiquement significatives de cancérogènes connus ou soupçonnés.

Il faut aussi s'assurer que les animaux de laboratoire seront bien exposés à la substance à tester et non à une série de ses produits de décomposition. La stabilité de la substance dans les conditions d'exposition du milieu dans lequel elle doit être administrée doit par conséquent être déterminée. Ainsi, si la substance doit être administrée mélangée aux aliments ou à l'eau potable, sa stabilité dans les aliments en question ou dans l'eau potable doit être déterminée et il faut préparer des lots frais aussi souvent que cela est nécessaire pour éviter toute décomposition ou perte excessive par évaporation. Lorsque la substance est trop instable pour être administrée en même temps que les aliments ou se volatilise à un rythme significatif, on l'administre d'habitude par gavage, malgré la difficulté de la procédure.

Si le produit à tester doit être administré par inhalation, il faut s'assurer qu'il est stable dans l'air et que sa granulométrie lui permet de pénétrer dans les plus petites ramifications des voies respiratoires. Par exemple, bien que le nickel métallique soit stable dans une masse solide, certaines de ses formes spécialement préparées, dispersées et spongieuses, comme le catalyseur d'hydrogénation connu sous le nom de nickel Raney, sont pyrophores et réagissent avec l'oxygène de l'air.

Les enduits dermiques, les injections sous-cutanées et les injections intrapéritonéales sont utilisés bien moins souvent que l'administration orale ou par inhalation dans les bio-essais de routine. Ils ne présentent pas généralement les problèmes soulevés dans ce chapitre, car il est possible de préparer les

solutions de l'agent à tester juste avant l'administration. Il n'en faut pas moins toujours s'assurer que le produit testé atteint bien le tissu cible à la dose et sous la forme prévues, notamment dans le cas de l'enduit dermique.

Les critères qui président au choix de la voie d'administration de la substance chimique à tester font l'objet de la section 4.2.3.

4.2.2 Choix des espèces et des souches animales

Idéalement, les bio-essais de cancérogénèse devraient toujours être effectués sur des espèces qui réagissent à l'agent à tester de la façon qui se rapproche le plus possible de celle des humains. En pratique, cela n'est guère faisable vu le caractère onéreux des bio-essais et leur durée. La cancérogénèse doit en effet s'étendre sur une partie appréciable de la vie de l'animal; les bio-essais effectués sur des chiens pourraient ainsi devoir être poursuivis pendant 10 ans ou plus avant qu'un degré acceptable de sécurité soit atteint, et pendant 25 ans ou plus pour certaines espèces de primates non humains. Et ces deux espèces sont coûteuses à l'achat et extrêmement dispendieuses à entretenir.

Le bio-essai de cancérogénèse courant exige l'utilisation de deux espèces de remplacement au cas où l'une ne réagirait pas à la cancérogénicité de l'agent à tester. En pratique, on choisit habituellement des rats et des souris, malgré la forte incidence de tumeurs spontanées dans certains de leurs tissus. Le hamster est moins souvent utilisé, sauf dans certaines études d'inhalation, où il a donné des résultats très satisfaisants, et dans l'évaluation des proliférateurs peroxysomes. Les souches et les espèces d'animaux de laboratoire chez qui les tumeurs d'origine naturelle sont fréquentes (Tarone et coll., 1981) ne devraient pas être utilisées dans un bio-essai de cancérogénèse. Ces tumeurs peuvent en effet compliquer l'interprétation de la signification des tumeurs induites dans les tissus affectés.

4.2.3 Voies d'administration de la substance chimique à tester

La voie d'administration de la substance chimique soumise à un bio-essai de cancérogénèse devrait ressembler le plus possible à la principale voie d'exposition de la population humaine. Les produits chimiques utilisés dans l'alimentation devraient donc être administrés avec les aliments tandis que les produits pharmaceutiques devraient être administrés de la même façon qu'aux patients.

La voie d'administration offre la possibilité de contrôler le degré et le type d'exposition des tissus à l'agent testé. Dans la plupart des cas, cet agent atteint sa plus forte concentration au site d'entrée dans l'organisme. L'inhalation permettra donc d'obtenir les plus fortes concentrations dans les poumons, l'enduit dermique, les plus fortes expositions cutanées, et l'injection, les plus fortes concentrations dans un tissu local.

Avec l'administration orale, les aliments, après être passés par l'oesophage, peuvent être stockés dans le pré-estomac du rongeur, avant de passer dans l'estomac, puis dans l'intestin. En général, l'absorption est à son maximum dans l'intestin, d'où l'agent est transporté par la veine porte jusque dans le foie. De tous les organes, c'est habituellement le foie qui présente le meilleur potentiel de métabolisation des substances chimiques; il réduit donc la quantité de l'agent administré qui atteint les tissus. Dans certains cas précis, toutefois, la flore microbienne de l'intestin arrive à dégrader considérablement certains agents testés, tels que les composés colorants azoïques.

4.2.4 Choix de la dose

Le choix de la dose pose deux problèmes. Le principal est de déterminer la dose la plus forte à administrer aux animaux; l'autre, plus simple, consiste à choisir les deux ou trois doses plus faibles à utiliser dans une étude. La difficulté d'établir la dose la plus élevée découle de la nécessité de déterminer une valeur de dose qui présente la plus forte probabilité de tumorisation sans réduire la durée de vie ou dégrader l'état clinique de l'animal testé, et qui soit en même temps la plus forte dose possible qui remplisse ces conditions. En effet, si l'on n'utilise pas la plus forte dose tolérée, on risque d'obtenir un résultat contradictoire positif à la répétition de l'étude si celle-ci est effectuée avec une dose plus élevée, mais toujours tolérée. On risque ainsi de miner la confiance de la population à l'endroit des procédures d'essai et de réglementation. La plus forte dose qui répond à ces critères est appelée dose maximale tolérable (DMT) (*National Toxicology Program, 1984*) :

La dose maximale, lorsqu'elle est administrée aux animaux pour la durée d'une étude de cancérogénèse, ne produira pas d'effets autres que tumoraux sur la longévité des animaux traités et n'entraînera pas de réduction de leur poids corporel supérieure à 10 p. 100 comparativement aux témoins. Cette dose ne devrait donner lieu à l'apparition d'aucune manifestation morphologique de toxicité qui nuirait à l'interprétation de l'étude.

L'interprétation des effets non tumoraux doit être effectuée avec soin et peut nécessiter l'établissement d'une liste tissu par tissu des lésions pertinentes et non pertinentes.

Les renseignements obtenus des tests de toxicité aiguë peuvent aider grandement le chercheur expérimenté à établir les doses à administrer dans l'étude sur 14 à 28 jours. Dans ce genre d'étude, l'agent à tester est administré par la voie choisie pour le bio-essai final et les résultats servent à déterminer une gamme préliminaire. L'étude subchronique sur 90 jours peut être considérée comme une «générale» du bio-essai de cancérogénèse comme tel. Les doses devraient être fixées de façon qu'au moins l'une d'entre elles dépasse la DMT. L'examen clinique, l'analyse biologique, les analyses de sang et d'urine devraient être au moins aussi poussés et aussi fréquents que dans le bio-essai final combiné cancérogénèse-toxicité chronique. Les facteurs comme les aliments consommés et la prise de poids corporel doivent être surveillés de près au moins une fois par

semaine. À la fin du test, un examen postmortem méticuleux de chaque animal (nécropsie) doit être effectué, et une gamme complète de tissus doivent être soumis à des examens pathologiques. L'attention portée à ces observations déterminera le succès du bio-essai de cancérogénèse.

4.2.5 Nombre d'animaux à utiliser

En général, on utilise, dans un bio-essai de cancérogénèse, une cinquantaine d'animaux de chaque sexe pour chaque dose, parallèlement à un nombre égal ou supérieur d'animaux témoins de chaque sexe non traités et, selon la méthode d'administration utilisée, traités avec l'excipient utilisé. Ces nombres minimaux constituent un compromis entre ce qui est souhaitable pour protéger la population humaine et ce qui est abordable si l'on veut soumettre une proportion raisonnable des substances chimiques à tester à des essais de cancérogénèse (Gart et coll., 1986).

4.2.6 Régime alimentaire

Le régime alimentaire des animaux d'expérience peut influer sur de nombreux facteurs qui entrent en jeu dans leur réponse à un agent toxique au cours du bio-essai. Il est par conséquent essentiel d'utiliser un régime normalisé pendant l'essai. En pratique, il existe trois types de régimes qui peuvent servir dans un essai de cancérogénèse sur des rongeurs : un régime à formulation fermée, un régime à formulation libre et un régime semi-purifié.

En général, les animaux utilisés dans les bio-essais de cancérogénèse sont nourris sur demande, c'est-à-dire que les animaux, traités et non traités, ont libre accès à la nourriture. Certains ont soutenu (et certains toxicologistes l'ont en fait mis en pratique) qu'un niveau d'alimentation restreint à 75-85 p. 100 du niveau non contrôlé serait préférable. Mais comme les restrictions alimentaires réduisent la prolifération cellulaire et l'incidence tumorale (Lok et coll., 1988) et augmentent la longévité des animaux testés, cela pourrait entraîner des complications majeures pour l'interprétation de l'étude.

4.2.7 Évitement des biais

À cause des coûts élevés, il est extrêmement important que chaque bio-essai de cancérogénèse soit effectué avec le plus de soin et d'exactitude possible. Toutes les occasions d'éviter un biais dans l'étude doivent être saisies (Gart et coll., 1986).

La répartition aléatoire des animaux est à ce titre importante, étant donné que même les animaux les plus proches sur le plan génétique peuvent présenter de légères variations héréditaires imputables aux différences du milieu dans lequel ils ont vécu depuis leur conception.

La répartition aléatoire des animaux dans le milieu permet de compenser, par exemple, le fait que certains d'entre eux peuvent se trouver à une distance différente de la source de lumière dans la pièce qui leur est réservée, ou être plus susceptibles que d'autres aux courants d'air. La façon de compenser ce genre d'éventualité est de déplacer les râteliers ou de changer la position de chaque cage dans le râtelier de façon prédéterminée, mais aléatoire. Si cette méthode est adoptée, le directeur de l'étude doit absolument s'assurer que le personnel est au courant des changements de position des cages de façon à ne pas se tromper dans les rations alimentaires des animaux. Il est donc très important d'adopter un certain type de code de couleurs.

D'autres facteurs peuvent introduire un biais. Par exemple, le nombre d'animaux qui se trouvent dans une cage peut varier; on peut aussi décider de sacrifier les animaux malades dans l'étude. Le nombre d'animaux qui se trouvent dans une même cage peut varier au cours du bio-essai à cause de l'attrition. Par exemple, on sait depuis de nombreuses années que des groupes de 50 souris gardées dans une même cage présentent un moins grand nombre de tumeurs mammaires spontanées que celles qui sont seules dans leur cage. Ce phénomène est dû au fait que les animaux en groupes doivent entrer en compétition pour leur accès à la nourriture alors que ce n'est pas le cas de la souris logée seule. La meilleure façon de surmonter ce problème habituellement mineur est de loger tous les rongeurs individuellement.

4.2.8 Durée de l'étude

Comme l'incidence du cancer augmente avec l'âge, le bio-essai de cancérogénèse doit se poursuivre sur une proportion appréciable de la durée de vie prévue des animaux testés : 2 ans pour les rats, et de 18 à 24 mois pour les souris et les hamsters. Comme on a observé chez les rats utilisés dans les bio-essais au cours de la dernière décennie une augmentation du poids corporel et une diminution de la longévité, il se pourrait qu'il faille en tenir compte dans la durée des bio-essais.

4.2.9 Protocoles spéciaux

Il arrive qu'il faille, pour diverses raisons, avoir recours à des protocoles spéciaux ou considérablement modifiés pour détecter les cancérogènes.

4.2.9.1 Protocoles étendus

Les essais combinés de cancérogénèse-toxicité chronique, tels que décrits par l'Organisation de coopération et de développement économique (OCDE, 1984), tentent d'étudier les deux phénomènes dans le cadre d'un même bio-essai. Ils consistent entre autres à ajouter pour chaque niveau de dose du bio-essai de cancérogénèse des groupes supplémentaires d'animaux que l'on sacrifie à des intervalles prédéterminés pour étudier l'évolution des lésions chroniques sous

l'influence de l'agent testé. Ce genre d'essai est recommandé par la Direction générale de la protection de la santé parce qu'il permet en fin de compte de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Le protocole sur deux générations (de la conception au décès) a gagné la faveur des chercheurs dans les années 1970, à titre de moyen idéal pour reproduire l'exposition des humains aux produits chimiques comme les additifs alimentaires, les polluants environnementaux et les médicaments. Les humains peuvent en effet être exposés à ces substances chimiques à tous les stades de leur développement et pendant leur vie adulte. Dans les études sur 2 générations, des groupes d'au moins 50 animaux de chaque sexe sont exposés à des concentrations choisies de l'agent à tester pendant 60 jours ou plus, puis sont accouplés. Une fois l'accouplement réussi, les mâles sont sacrifiés. Les femelles parentes sont gardées et nourries selon leur régime alimentaire respectif jusqu'à la fin de la grossesse, de l'allaitement et du sevrage. Les petits sont ensuite nourris selon le même régime jusqu'à la fin de l'expérience. De cette façon, l'exposition est continue depuis la conception jusqu'à la mort des petits.

Cette méthode de bio-essai pose deux grands problèmes techniques. Le premier tient au fait que l'organisme qui se développe (le fœtus, le nouveau-né et le nourrisson) subit des changements marqués de ses propriétés biochimiques et physiologiques comparativement à l'adulte et que, par conséquent, sa réponse aux produits toxiques diffère. Le deuxième vient de ce que le chercheur doit choisir un ou deux animaux de chaque sexe dans chaque portée pour compléter les groupes d'étude des petits.

4.2.9.2 Protocoles mécanistes

Le protocole initiation-promotion est simple en soi. Dans sa plus simple expression, il nécessite 4 groupes, habituellement de 20 à 40 animaux chacun. Deux de ces groupes se voient administrer une dose unique ou reçoivent le cancérogène sur une certaine période. Après un intervalle qui peut aller d'une journée à plusieurs semaines, l'un de ces groupes traités et un autre groupe non traité reçoivent l'agent promoteur présumé en administration répétée ou continue jusqu'à l'apparition de tumeurs. Une augmentation globale du nombre de tumeurs induites, malignes ou bénignes, est considérée comme une preuve que le produit testé est un promoteur. Les promoteurs sont habituellement administrés pendant la majeure partie ou la totalité du temps nécessaire au développement des tumeurs. Lorsqu'elles sont bénignes, les tumeurs induites régressent souvent à l'arrêt du traitement de promotion. C'est pourquoi il est très difficile pour la personne qui évalue ces résultats d'appliquer ces données sur la promotion aux produits chimiques auxquels les humains sont exposés pendant des périodes beaucoup plus limitées.

4.2.9.3 Protocoles rapides

Les protocoles rapides ne sont guère utiles aux fins de la réglementation, car ils sont spécifiques au tissu – p. ex., le test de l'adénome pulmonaire de la souris de souche A (Shimkin et Stoner, 1975), l'essai hépatique chez les rongeurs ou l'essai cutané chez la souris – et dépendent parfois de l'augmentation d'une forte incidence naturelle de tumeurs dans le tissu particulier. Cela rend leurs résultats difficiles à interpréter et nous ne nous y attarderons pas davantage.

4.3 Considérations pratiques

L'entretien des animaux dans un bio-essai (Arnold et coll., 1990), l'examen *post mortem* et l'examen pathologique des tissus (Hardisty et Eostis, 1990), et l'analyse statistique subséquente des résultats (Krewski et Franklin 1991) ont tous déjà été décrits en détail. Le lecteur qui désire en savoir davantage à ce sujet est donc prié de consulter la documentation pertinente.

5. Détermination des expositions humaines

5.1 Rôle de l'évaluation de l'exposition

Pour déterminer le risque que présente une substance quelconque, il faut évaluer à quel point les gens y sont exposés. L'effet indésirable d'une exposition peut être déterminé au moyen d'études toxicologiques sur des organismes d'essai non humains ou au moyen d'études épidémiologiques. L'évaluation de l'exposition peut être définie comme l'étude de la quantité d'une substance qui entre en contact avec un organisme vivant; le risque est la probabilité de survenue d'un effet indésirable. La fiabilité de l'évaluation du risque dépend de nombreuses variables, dont la pertinence de l'organisme testé et de l'effet indésirable, de même que de la validité de l'extrapolation de la voie et de la durée d'exposition utilisées dans les études animales à l'exposition humaine prévue.

Par exemple, les effets cancérogènes ou chroniques observés dans le cadre d'études toxicologiques portant sur toute la vie sont ceux qui conviennent le mieux à l'évaluation des risques associés à une exposition chronique à un produit toxique chez les humains. Les voies d'exposition devraient aussi, dans la mesure du possible, être semblables. Les risques humains dans le cas d'expositions cutanées professionnelles sont souvent difficiles à évaluer à partir d'études effectuées sur des rongeurs, qui se font habituellement par voie orale. Bien que les effets indésirables observés directement dans les populations humaines n'aient pas à faire l'objet d'une extrapolation entre espèces, ils sont souvent le résultat d'expositions qui peuvent dater de nombreuses années, ce qui rend pratiquement impossible l'évaluation exacte de l'exposition.

Comme l'a souligné Severn (1987) dans son examen des évaluations de l'exposition conduites dans le cadre des analyses des risques de cancer, le calcul de l'exposition évalue quantitativement les contributions respectives des voies orale, cutanée et pulmonaire et décrit l'exposition en fonction du temps. L'origine du produit chimique analysé doit également être déterminée. Il existe de nombreuses sources différentes d'exposition aux agents chimiques et physiques, dont le lieu de travail, les aliments, l'eau potable, divers biens de consommation, l'élimination des déchets, le transport et le milieu ambiant. Des lignes directrices adoptées à l'échelle internationale établissent les divers types de données nécessaires selon la source d'exposition. Ces directives se penchent également en détail sur les méthodes d'échantillonnage et d'analyse passées et présentes pour divers groupes de substances (CIRC, 1984; *U.S. Environmental Protection Agency*, 1986, 1987b; *U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens*, 1986; *U.S. Congress Office of Technology Assessment*, 1987).

Bien que l'examen de toutes les sources d'exposition et des méthodes de surveillance dépasse largement la portée du présent rapport, nous traiterons brièvement ici de l'évaluation des expositions professionnelles et des expositions

d'origine alimentaire aux agents cancérogènes potentiels. Les expositions professionnelles peuvent être relativement importantes et contaminer les travailleurs par plus d'une voie; les expositions alimentaires sont en général relativement minimes, avant tout orales, et sont réparties sur de longues périodes.

Nous traiterons dans ce chapitre de la façon dont les expositions humaines sont déterminées, des limites de nos connaissances actuelles en matière d'évaluation des expositions et des problèmes spéciaux que soulèvent les estimations d'exposition pour l'évaluation des risques de cancer que courent les populations humaines.

5.2 Principes de l'évaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition repose sur le grand principe suivant : la personne, le groupe ou la région étudié doit être aussi représentatif que possible de la population étudiée. Par exemple, pour évaluer l'exposition professionnelle d'un agriculteur qui utilise des pesticides, il faut suivre l'agriculteur en question pendant toute une journée de travail au cours de laquelle il (ou elle) effectue toutes ses activités habituelles, vêtu de ses vêtements de travail ordinaires. La surveillance doit également se faire lorsqu'il y a une possibilité raisonnable d'exposition.

Le *U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens* (1986) a établi cinq principes pour l'évaluation de l'exposition :

1. Les voies d'exposition utilisées dans les études sur les effets d'une substance sur la santé des animaux devraient pouvoir se comparer aux voies d'exposition des personnes [...] étant donné qu'il peut y avoir d'importantes différences dans les paramètres moléculaires, biochimiques et physiques des organes selon la voie d'exposition.

2. Comme, à l'heure actuelle, il n'existe aucune procédure unique d'application générale pour l'évaluation exhaustive de l'exposition, à court terme, les évaluations d'exposition intégrées (faisant appel à des données de surveillance, aux résultats de modèles physiques et chimiques et à l'examen de toutes expositions dans tous les milieux) seront surtout effectuées cas par cas.

3. Le degré de détail et de précision d'une évaluation de l'exposition devrait être fixé de façon à fournir le niveau de connaissance nécessaire pour répondre aux besoins d'analyse. Une évaluation préliminaire établie à l'aide des données brutes disponibles peut souvent donner une idée des limites supérieure et inférieure des risques potentiels.

4. L'évaluation de l'exposition devrait établir la puissance, les limites et les incertitudes des données et des modèles existants et faire état des hypothèses qui ont servi à établir les estimations.

5. En général, il est préférable de donner une série ou une gamme de valeurs d'exposition plutôt qu'une estimation numérique unique.

5.3 Méthodologie de l'évaluation de l'exposition

Callahan (1987) a dénombré trois grandes approches utilisées dans l'évaluation de l'exposition :

1. la mesure directe : mesure de l'exposition au moment même où elle se produit

2. la prévision : évaluation de l'exposition à partir de données de surveillance, de modèles et de l'activité de la population

3. la reconstitution : essai de reconstitution de l'exposition passée à partir des indices qui restent des expositions, tels que les teneurs tissulaires ou les biomarqueurs et à l'aide d'autres instruments tels que la pharmacocinétique.

Nous examinerons ici les études de surveillance qui font appel à une combinaison de ces trois approches.

Certaines méthodes d'évaluation des expositions ont été élaborées spécialement en fonction de la source d'exposition; nous nous concentrerons ici sur les méthodes utilisées pour évaluer l'exposition professionnelle et l'exposition alimentaire.

5.3.1 Études de surveillance

Il existe en gros deux types d'études de surveillance : la surveillance du milieu ambiant et la surveillance biologique. La surveillance du milieu ambiant consiste à mesurer la quantité d'une substance présente dans le milieu sous forme absorbable, tandis que la surveillance biologique consiste à mesurer la dose systémique ou interne. Les deux types de surveillance tiennent compte des voies d'exposition directes et indirectes. Pour Kutz (1983), les voies directes sont celles qui permettent à la substance chimique de pénétrer directement dans l'organisme, par ingestion, par inhalation ou par contact cutané, et sont normalement observées sur les lieux de travail; l'exposition indirecte consiste habituellement en l'ingestion d'aliments ou de boissons contaminées ou en un contact avec d'autres éléments contaminés du milieu.

5.3.1.1 Surveillance du milieu ambiant

La surveillance du milieu ambiant peut être subdivisée en surveillance de l'environnement et en surveillance individuelle. La surveillance de l'environnement porte sur la quantité d'une substance présente dans une région ou dans un contexte donné, et consiste habituellement en mesures atmosphériques. La surveillance individuelle mesure la quantité d'une substance qui entre en contact avec une personne.

5.3.1.1.1 Surveillance de l'environnement

La surveillance de l'environnement ou la mesure de la qualité de l'air ambiant est peut-être le type de surveillance des expositions le mieux connu et le plus souvent utilisé pour mesurer les teneurs en polluants d'un endroit donné dans une installation industrielle (Hushon et Clerman, 1981). Ce genre d'étude est d'une application plus vaste que beaucoup d'autres méthodes utilisées en milieu de travail et sert également à évaluer l'exposition de l'ensemble de la population aux polluants environnementaux. La surveillance environnementale permet de recueillir des échantillons pour analyse ultérieure, d'obtenir des lectures en continu ou d'alerter les travailleurs lorsqu'un niveau dangereux prédéterminé de polluant est atteint. Ce niveau, appelé «valeur limite d'exposition» (TLV), «limite accessible» ou «limite recommandée d'exposition professionnelle à visée sanitaire» (Organisation mondiale de la santé, 1984), est fondé sur un examen toxicologique et une détermination des niveaux sans effet observé (NOEL). Bien que ces valeurs limites soient largement acceptées et utilisées dans l'industrie depuis de nombreuses années, on a plutôt tendance à penser aujourd'hui que ce genre d'approche pose problème. Parmi ses inconvénients, on mentionne les suivants : (i) souvent, seule l'exposition par inhalation est prise en considération, (ii) les échantillons ne sont habituellement pas prélevés dans la zone de respiration des personnes, et (iii) les changements dans le taux d'activité physique et le rythme de la respiration des personnes ne sont pas pris en considération.

Henschler (1984) analyse les limites du recours aux valeurs limites en ce qui a trait aux cancérogènes en milieu de travail. Selon lui, les premières séries de limites d'exposition englobaient effectivement certains cancérogènes certifiés, mais l'utilisation de la notion simpliste de NOEL ne peut plus aujourd'hui constituer un facteur de sécurité approprié pour l'évaluation des risques de cancer. C'est d'ailleurs pourquoi la communauté scientifique a adopté la notion de «dose pratiquement sûre», qui correspond à la limite d'exposition qui ne devrait entraîner aucun risque excessif mesurable. L'*American Conference of Governmental Industrial* Hygienists (1987) n'en continue pas moins d'attribuer des TLV aux cancérogènes confirmés et soupçonnés. L'organisme justifie son attitude en affirmant que l'attribution d'une TLV n'implique pas nécessairement qu'il existe un seuil biologique ou une NOEL clairement définie, et soutient au contraire que lorsque les expositions sont surveillées en fonction de ce seuil (TLV), les risques de cancer sont réduits au minimum et sont, par conséquent, peu susceptibles d'entraîner une morbidité ou une mortalité excessive.

5.3.1.1.2 Surveillance individuelle

La surveillance individuelle, également appelée dosimétrie passive, porte habituellement sur trois voies d'exposition : cutanée, pulmonaire et orale. Comme nous l'avons déjà souligné, ce type de surveillance personnelle évalue la quantité d'une substance qui affecte l'individu. Durham (1981) a noté que les méthodes de piégeage direct utilisées dans ce type d'étude ont l'avantage de donner une valeur absolue pour une exposition individuelle, même à l'intérieur d'une série

d'expositions répétées à la même substance chimique. Ce type de surveillance peut également servir à différencier les apports relatifs des différentes voies d'exposition.

A. Études cutanées

L'exposition cutanée est établie par la mesure de la quantité d'une substance qui se dépose sur la peau de la personne exposée; cette valeur est ensuite utilisée pour extrapoler une dose absorbée. Le dépôt est mesuré de plusieurs façons : en plaçant des plaques absorbantes (test épicutané) à certains endroits stratégiques du corps de la personne et en extrapolant le résultat obtenu à l'ensemble de la surface exposée, en analysant les vêtements que porte la personne exposée et en utilisant un solvant absorbant pour enlever la substance de la peau au moyen d'un rinçage des mains ou d'un badigeonnage de la peau.

L'inconvénient de mesurer le dépôt sur une petite surface, comme c'est le cas dans le test épicutané, vient de la possibilité d'erreur dans l'extrapolation à l'ensemble du corps de la quantité de résidus qui s'est déposée sur cette superficie minime (Reinert et coll., 1986; *U.S. Environmental Protection Agency*, 1987b). De surcroît, on risque ainsi de passer à côté de certaines surfaces d'exposition importantes, selon l'endroit où est placé le dispositif de piégeage (Franklin et coll., 1981). L'emploi de méthodes d'analyse des dépôts cutanés pour l'évaluation de l'exposition a par contre l'avantage de donner des estimations qui peuvent être appliquées de façon générale à des scénarios d'utilisation semblables, étant donné que le dépôt semble dépendre de paramètres physiques plutôt que de paramètres chimiques. Un autre avantage vient de ce que ces méthodes permettent de déterminer quelle zone du corps est la plus exposée et quel type d'activité est le plus susceptible d'entraîner une forte exposition, et donc, de faire des recommandations relativement aux types de vêtements protecteurs à porter pour une activité ou un scénario d'exposition particulier.

Une fois le dépôt mesuré, il faut estimer la quantité de la substance chimique qui est absorbée par la peau de façon à établir la dose absorbée. L'absorption est normalement estimée au moyen d'études de pénétration cutanée *in vivo* ou *in vitro*. D'habitude, les études *in vivo* sont effectuées sur des rats, dont on mesure l'excrétion de radioactivité à la suite d'une application topique du composé marqué. Cette méthode est souvent utilisée, mais plusieurs facteurs doivent être pris en considération lors de l'interprétation des données. La pénétration peut en effet varier selon le site anatomique (Maiback et coll., 1971), la concentration et le moment du dosage, et le modèle animal choisi (Franklin, 1989). Les méthodes *in vitro* font appel à un appareil cellulaire statique ou à écoulement continu dans lequel peut être mesuré le taux d'absorption de la substance chimique testée sur une membrane de peau humaine, animale ou synthétique.

Bien que les systèmes *in vitro* présentent plusieurs avantages, tels que la simplicité, la rapidité, l'économie et la possibilité d'obtenir des modèles de peau humaine, ils laissent cependant place à de nombreuses incertitudes (Franklin, 1989). Si la méthode semble bien se comparer aux méthodes *in vivo* pour les composés hydrophiles, elle apparaît moins fiable pour les composés hydrophobes

(Franklin et coll., 1989). Souvent, en outre, elle ne tient pas compte de la viabilité et du métabolisme de la peau, qui jouent un rôle crucial dans l'absorption. Les travaux dans ce domaine progressent toutefois rapidement et semblent fort prometteurs.

B. Exposition par inhalation

Comme l'exposition cutanée, l'exposition par inhalation varie selon le dépôt du produit dans les voies respiratoires (en particulier les poumons, les bronches ou la trachée) et son absorption dans le sang. Ce dépôt dépend à son tour des caractéristiques physiques du contaminant, tandis que l'absorption dépend avant tout de ses caractéristiques physiques et chimiques (Bennett, 1986) et de l'anatomie ainsi que du rythme respiratoire de la personne (Lippmann, 1987). Le dépôt et l'absorption subséquente du produit dépendent du site où vont se loger les particules dans les voies respiratoires et de leur taille; les particules respirables ont une taille inférieure à environ 10 µm (Bennett, 1986).

Les dépôts peuvent être mesurés par piégeage direct à l'aide de plusieurs dispositifs, dont les échantillonneurs actifs individuels, les échantillonneurs décomposeurs, les échantillonneurs instantanés et les échantillonneurs passifs à diffusion, tels que les écussons de charbon de bois. En milieu de travail, les échantillonneurs ou les moniteurs individuels sont souvent préférables; ceux-ci sont placés dans «l'aire de respiration» de la personne et reliés à une pompe qui aspire l'air à un rythme préétabli, qui ressemble à celui de la respiration humaine normale. Un filtre de sorbant solide est placé dans le moniteur pour piéger le produit chimique. Le choix du filtre dépend de la nature physique et chimique de la substance à tester (pour une description plus détaillée, voir Bristol et coll., 1984).

Bien qu'il faille tenir compte de l'absorption, comme nous l'avons noté plus haut, on suppose souvent que la substance prélevée de cette façon est absorbée à 100 p. 100. Un facteur peut conduire à surestimer l'exposition : la remise en suspension du contaminant présent sur les vêtements de la personne, qui peut ainsi pénétrer dans le moniteur, habituellement placé sur le revers de la veste (Cohen et coll., 1984). Cohen et ses collaborateurs (1984) ont proposé de corriger la situation au moyen d'une rallonge qui permettrait de mieux simuler la position du nez et de la bouche.

C. Exposition par voie alimentaire

Pour évaluer les risques éventuels d'exposition aux substances chimiques par voie alimentaire, il faut déterminer le degré d'absorption de la substance en question et le mettre en relation avec l'estimation de l'absorption acceptable ou tolérable établie par les études de toxicologie.

Deux facteurs de base doivent être pris en considération dans l'évaluation de l'apport alimentaire : (i) la teneur de la substance dans les aliments, et (ii) le rythme de la consommation de l'aliment (ou des aliments) qui peut contenir cette substance.

Il est d'abord nécessaire d'identifier le ou les aliments qui peuvent éventuellement contenir la substance à tester. Dans le cas d'un contaminant environnemental omniprésent, il faut parfois prendre en considération tous les aliments; par contre, dans le cas d'un additif alimentaire utilisé seulement dans quelques aliments, par exemple, l'huile végétale, une seule composante du régime peut suffire.

a. Teneur de la substance dans les aliments

La teneur de la substance chimique dans les aliments peut être déterminée au moyen d'une surveillance des approvisionnements. À cette fin, il importe de connaître les usages qui font que la substance en question se trouve dans l'aliment, de même que la teneur maximale normalement observée lorsque la substance en question est utilisée conformément aux pratiques établies. Ces teneurs maximales prévues servent à estimer les expositions des pires cas pour les substances ajoutées de façon délibérée, telles que les additifs alimentaires ou les pesticides, et conduisent à surestimer l'absorption pour les raisons suivantes (Gunner et Kirkpatrick, 1979; OMS, 1989) :

1. La substance n'est pas nécessairement utilisée dans ou sur tous les aliments pour lesquels elle est autorisée.

2. La substance n'est pas nécessairement présente dans l'aliment à la teneur maximale.

3. La teneur initiale de la substance peut diminuer au cours de la transformation commerciale ou de la cuisson de l'aliment.

La surestimation de l'absorption résultant de ces hypothèses de pire éventualité donne une marge de sécurité supplémentaire dans l'estimation des apports alimentaires. On peut obtenir des évaluations plus réalistes en tenant compte de certains facteurs supplémentaires, dont la distribution de la substance dans l'aliment, les effets de la transformation et de la cuisson, et les données sur les teneurs mesurées de la substance dans l'aliment. Pour obtenir les données sur les teneurs réelles de ces substances dans les aliments on peut consulter plusieurs sources, dont les demandes présentées par l'industrie, les recherches maison (p. ex., Dabeka et Mckenzie, 1987), les enquêtes de surveillance effectuées par la Direction des opérations sur le terrain de la Direction générale de la protection de la santé, d'autres ministères fédéraux (p. ex., Agriculture Canada, 1987), divers organismes provinciaux (p. ex., Frank et coll., 1987a, 1987b), ou les rapports publiés d'enquêtes internationales (p. ex., programme GEMS de l'Organisation mondiale de la santé) ou d'autres enquêtes dont il est fait état dans la documentation scientifique (p. ex., Gartrell et coll., 1986a, 1986b; Gunderson 1988).

b. Niveau de consommation

Les méthodes qui permettent d'estimer les apports de substances chimiques dans les aliments chez les humains sont essentiellement les mêmes que celles que l'on utilise pour estimer les apports alimentaires comme tels ou les apports d'une

composante alimentaire quelconque. Les diverses approches sont bien documentées et commentées en détail dans la documentation (Pekkarinen, 1970; Marr, 1971; Bazzarre et Mayers, 1978; Gunner et Kirkpatrick, 1979; OMS, 1985).

Il y a deux grandes méthodes de collecte d'information sur les habitudes alimentaires d'une population ou d'un groupe de personnes. La première consiste à recueillir des données indirectes sur le flux et la disparition des denrées alimentaires dans une région, et la deuxième, à recueillir directement auprès des gens des données sur les quantités réelles de nourriture consommée par une personne ou un ménage.

La méthode indirecte puise à même les données nationales ou régionales sur la disparition des aliments. On obtient une estimation de la consommation par habitant en divisant par la population totale le chiffre annuel sur la disparition d'un aliment en particulier (Statistiques Canada, 1986). Ce genre d'estimation ne constitue cependant qu'une première approximation, étant donné qu'il tient habituellement peu compte, sinon pas du tout, du gaspillage, des variations saisonnières ou de la distribution des aliments au sein de la population en fonction de critères géographiques, sociaux ou économiques (Conacher et coll., 1989). Cette approche ne tient donc pas compte non plus des consommateurs atypiques ou des segments particuliers de la population qui pourraient nécessiter une attention spéciale, tels que les nourrissons, les enfants et les femmes enceintes. Il importe donc de reconnaître que les estimations de l'apport alimentaire obtenues à partir de l'hypothèse selon laquelle un produit est consommé par toute la population peuvent sous-estimer ou surestimer l'apport réel pour divers segments de la population dont les habitudes alimentaires varient.

Malgré ces difficultés, on considère généralement que cette méthode permet de faire un dépistage valable et de déterminer les situations qui devraient donner lieu à une étude plus détaillée.

Les méthodes utilisées pour évaluer l'apport alimentaire individuel sont beaucoup plus complexes. Une multitude de facteurs entrent en effet en ligne de compte dans la conception d'une enquête sur l'alimentation acceptable : méthode de déclaration des données (p. ex., journal alimentaire ou anamnèse alimentaire), durée de la période d'étude (p. ex., anamnèse sur 24 heures ou journal sur 7 jours), portée de l'enquête (p. ex., tous les aliments ou certains produits couramment consommés seulement), et caractéristiques démographiques de la population (p. ex., âge, sexe, race, profil socio-économique, régions étudiées) (Gunner et Kirkpatrick, 1979; OMS, 1985). L'incidence de ces différents facteurs doit être prise en considération dans l'interprétation et l'utilisation des données sur l'apport alimentaire.

Ces études fournissent des données sur les quantités représentatives d'aliments consommés par une personne et peuvent servir à établir la consommation des percentiles moyens et supérieurs dans le sous-ensemble de la population générale à l'étude, de même que chez les seuls consommateurs des aliments considérés. Il est particulièrement important de porter attention à la consommation du percentile

supérieur lorsque la consommation d'un aliment particulier varie considérablement à l'intérieur de la population dans son ensemble ou du sous-ensemble considéré (p. ex., les jeunes enfants) (Coomes et coll., 1982).

Une enquête sur les habitudes alimentaires des Canadiens effectuée en 1970-1972 a permis de recueillir de l'information sur la consommation moyenne, la distribution de la consommation et la consommation maximale de divers groupes en divers endroits du pays (Nutrition Canada, 1976). D'autres sources d'évaluation de la consommation alimentaire sont utilisées à des fins de comparaison dont par exemple, une enquête nationale effectuée par le ministère de l'Agriculture américain (Pao et coll., 1982), une enquête sur la nutrition menée dans dix États (Center for Disease Control, 1972), et une enquête sur la santé et la nutrition (Health and Nutrition Examination Survey (HANES I)) (Abraham et coll., 1976). On peut également consulter les données d'enquête fournies par des requérants ou des associations industrielles sur certains articles précis, divers rapports préparés par des analystes indépendants ou les comptes rendus d'enquêtes publiés dans la documentation scientifique.

c. Estimation de l'exposition

Pour évaluer l'exposition humaine par voie alimentaire, on combine les données sur la teneur des aliments en substances chimiques et les données sur l'apport alimentaire. La teneur des aliments en substances chimiques est habituellement exprimée en partie par million (ppm, mg/kg aliments) ou en partie par milliard (g/kg d'aliments). Pour estimer l'apport alimentaire à partir d'une concentration individuelle, on multiplie la concentration (mg de substance chimique/kg d'aliment) par la consommation estimée de l'aliment en question (g d'aliment/ personne par jour). On divise ensuite ce nombre par 1000 pour obtenir une valeur en milligrammes de substance par personne dans la ration alimentaire quotidienne. Ces degrés d'exposition estimatifs sont ensuite regroupés pour tous les aliments dans lesquels on peut trouver la substance considérée et sont habituellement exprimés en milligrammes de substance par kilogramme de poids corporel par jour (c.-à-d. en divisant par le poids corporel d'une personne).

Une fois cette partie de l'évaluation terminée, on examine les autres voies d'exposition possibles (p. ex., l'air et l'eau) afin d'obtenir une évaluation de l'exposition totale à la substance en question. Dans certains cas (p. ex., les contaminants environnementaux ubiquistes), il est nécessaire de tenir compte de certaines voies d'exposition particulières, qui peuvent contribuer considérablement à la consommation de la substance par certains sous-groupes particuliers de la population (p. ex., pour estimer l'apport en plomb chez les enfants, il faut tenir compte du nombre de fois où ils portent normalement leur main à leur bouche). S'il n'existe aucune donnée fiable sur la contribution des autres voies d'exposition, on évalue toute autre information pertinente relative à la substance chimique en question afin de déterminer la probabilité d'une exposition à partir d'autres sources. Si cette probabilité existe, on examine s'il est possible d'évaluer cette exposition.

Une fois déterminé l'apport quotidien total probable de toutes sources de la substance chimique considérée selon le groupe d'âge, le sexe et les divers segments de la population, on compare la valeur obtenue avec les estimations toxicologiques de l'apport acceptable ou tolérable afin de déterminer si l'exposition à la substance dans les aliments pose un danger pour la santé.

En somme, l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques dans le régime alimentaire se fonde sur l'analyse de l'occurrence de la substance dans les aliments et sur les données sur la consommation. À l'heure actuelle, il n'y a pas de procédure unique d'application générale pour évaluer de ce genre d'exposition (Santé et Bien-être social Canada, 1989). Chaque évaluation porte donc sur un ensemble unique de circonstances qui demandent de tenir compte de différents facteurs à chacune de ses étapes pour vérifier l'intégrité de la base de données. L'évaluation globale consiste en réalité en une série d'évaluations de l'exposition alimentaire basées sur les percentiles moyens et supérieurs de la consommation des aliments selon le groupe d'âge et selon le sexe dans une population donnée. On peut ainsi examiner une série d'évaluation d'expositions pour les pires cas et les cas moyens et déterminer les segments de la population à plus haut risque.

5.3.1.2 Surveillance biologique

La surveillance biologique consiste à déterminer la teneur d'un produit chimique ou de ses métabolites dans un tissu biologique humain, comme le sang, l'urine, les fèces, les cheveux, l'haleine, la sueur et le gras. Le grand avantage de ce type de surveillance par rapport à la surveillance du milieu ambiant est de donner une idée de l'exposition par toutes les voies et de toutes les sources. Toutefois, l'interprétation des données exige alors une compréhension exhaustive des caractéristiques pharmacocinétiques de la substance testée.

Une foule d'auteurs ont d'ailleurs souligné l'importance de connaître la pharmacocinétique d'un composé lorsqu'on fait appel à la surveillance biologique pour en déterminer l'exposition (Aitio, 1984; Vainio, 1985; Aitio et Jarvisalo, 1985; Bernard et Lauwerys, 1986, 1987; Severn, 1987; Franklin, 1989; Ritter et Franklin, 1989). Il est en effet essentiel de savoir comment la substance est absorbée, comment elle est répartie ensuite entre les différents compartiments de l'organisme, de quelle façon elle est biotransformée, puis éliminée, et de savoir si elle s'accumule dans l'organisme (Bernard et Lauwerys, 1987). Ce genre de données est essentiel au choix des tissus biologiques qui se prêtent le mieux à l'échantillonnage et de la meilleure période d'échantillonnage.

L'exécution des études de surveillance biologique, de même que l'interprétation de leurs résultats, posent de nombreuses difficultés. D'après Aitio (1984), ces études comportent plusieurs sources d'erreurs, dont l'instabilité des concentrations des substances chimiques mesurées, les variations physiologiques, les effets pharmacocinétiques (p. ex., la demi-vie), la contamination des échantillons pendant leur prélèvement ou leur manipulation, les erreurs grossières de laboratoire, et les variations analytiques. L'observance des règles par les sujets peut également poser un problème.

Nous discuterons ci-dessous des deux grandes approches en matière de surveillance biologique.

5.3.1.2.1 Dosage d'une substance chimique ou de ses métabolites dans des fluides biologiques

Les substances biologiques les plus couramment utilisées pour la surveillance sont l'urine, le sang, l'haleine et, à un moindre degré, la sueur, le gras, les fèces, la salive, le lait maternel et les cheveux. Bien que la majorité des tests soient sélectifs à un composé chimique ou un métabolisme particulier, certains sont non sélectifs et spécifiques seulement à un groupe de produits (Bernard et Lauwerys, 1986).

A. Analyse de l'urine

L'urine et les fèces et, dans certains cas, l'haleine, représentent les principales voies d'expulsion des substances chimiques. Le prélèvement d'urine visant à déterminer la dose systémique d'une substance chimique est le moyen le plus commode et le plus pratique d'exercer une surveillance biologique, car c'est une méthode non effractive et relativement facile d'application. Pour mesurer la dose résultant d'une seule exposition, il faut cependant recueillir des échantillons d'urine sur une période entière de 24 heures, ce qui peut poser certains problèmes de respect des règles par les sujets de l'étude. Lorsqu'on mesure une exposition professionnelle à long terme, l'échantillonnage aléatoire permet d'obtenir une somme intégrée d'expositions cumulatives pour une période antérieure de plusieurs jours (Coye et coll., 1986). Toutefois, comme nous l'avons déjà souligné, il est essentiel de bien connaître la cinétique de la substance pour bien interpréter les données. Un des attraits de l'analyse d'urine pour les travailleurs en milieu professionnel vient de ce que la concentration d'un métabolite dans l'urine est beaucoup moins influencée par une exposition très récente que ne l'est la concentration du composé chimique inchangé dans le sang ou dans l'air alvéolaire (Bernard et Lauwerys, 1986, 1987).

B. Analyse du sang

Il est courant d'avoir recours à l'analyse du sang pour mesurer l'exposition lorsqu'il est impossible de procéder à l'analyse d'urine; ce test peut être utilisé lorsque l'exposition est trop faible pour obtenir des concentrations détectables de métabolites dans l'urine, lorsque la substance absorbée est mal transformée ou lorsque les métabolites urinaires n'ont qu'une très faible spécificité (Bernard et Lauwerys, 1987). Bernard et Lauwerys (1987) soulignent que le dosage d'une substance chimique non transformée dans le sang est habituellement plus spécifique que le dosage d'un métabolite, qui peut être commun à plusieurs substances. Par contre, les tests sanguins ont l'inconvénient majeur d'être effractifs; il est donc plus difficile d'amener les gens à s'y soumettre. Aitio (1984) fait également remarquer que lorsque l'exposition est surtout cutanée, l'endroit où l'on prélève le sang peut influer sur la concentration de la substance testée. De la

même façon, l'alimentation peut influer sur la concentration sanguine de la substance, car la teneur du sang en lipides et, donc, sa capacité de dissolution augmentent après un repas.

C. Analyse de l'haleine

L'analyse de l'haleine n'est pas aussi fréquente que l'analyse de l'urine ou du sang. D'après Droz et Guillemin (1986), cela tient à l'absence de méthodologie et de données de base suffisantes. Des méthodes ont toutefois été mises au point pour mesurer l'exposition aux polluants volatils, tels que le benzène, le toluène et le xylène (Pellizzari et coll., 1988). L'analyse de l'haleine offre l'avantage d'être non effractive, de pouvoir être utilisée pour un large éventail de composés et d'être plus simple que l'analyse du sang ou de l'urine vu la simplicité du milieu (Droz et Guillemin, 1986).

5.3.1.2.2 Mesure des effets biologiques inoffensifs

Cette méthode d'analyse de l'exposition ne peut être utilisée que si le mode d'action de la substance chimique est bien compris, ce qui rend son usage limité. Lorsqu'elle peut être appliquée, elle permet d'évaluer indirectement la quantité de la substance chimique étudiée qui réagit avec les sites cibles (Bernard et Lauwery, 1987). Donnons comme exemple de ce genre de test l'inhibition de l'activité pseudocholinestérase, l'excrétion urinaire d'acide D-glucarique, le dosage de la métalothionéine dans l'urine, et l'alkylation des acides aminés dans les protéines circulantes. Neumann (1984), qui s'est servi de l'analyse de l'hémoglobine pour surveiller la dose des agents alkylants et arylants, a découvert que tous les agents génotoxiques étudiés jusqu'à présent réagissaient avec l'hémoglobine *in vivo*; la méthode pourrait donc, selon lui, être appliquée très souvent. Il a également observé que la concentration des dérivés d'hémoglobine était directement proportionnelle à la dose absorbée pour une vaste gamme de doses, bien qu'elle subisse l'influence de nombreuses caractéristiques propres à la personne testée, telles que ses propriétés pharmacocinétiques.

5.3.2 Études de modélisation

Le nombre d'études de modélisation effectuées pour mesurer l'exposition en milieu professionnel, dans l'air ambiant, ou découlant de l'utilisation de biens de consommation est relativement peu élevé. La plupart des modèles ont été élaborés pour mesurer les teneurs atmosphériques extérieures de polluants non réactifs. La plupart de ces modèles tiennent compte de la libération, du transport et de l'évolution de la substance chimique pour prévoir l'exposition des personnes en fonction des divers modes d'utilisation. Comme certains modèles peuvent être extrêmement complexes et difficiles à valider, il est donc important de les étayer par un échantillonnage.

5.4 Quelques problèmes importants qui influent sur l'interprétation des estimations de l'exposition

L'évaluation de l'exposition est une science multidisciplinaire encore très jeune et inexacte qui peut englober la toxicologie, la pharmacologie, la pharmaco-cinétique, la médecine, la biochimie, le génie environnemental et l'écologie. D'après le gestionnaire adjoint intérimaire de l'agence américaine de protection de l'environnement, l'évaluation de l'exposition est le chaînon le plus faible du processus d'évaluation des risques (Bretthauer, 1989). Bien que l'évaluation de l'exposition humaine soit plus avancée en milieu de travail que dans d'autres situations, l'utilisation que l'on peut faire des données ainsi recueillies est toujours fort limitée. Plusieurs problèmes importants viennent en effet compliquer l'interprétation des données sur l'exposition; nous les abordons en détail ci-dessous.

5.4.1 Variation de l'exposition dans le temps

L'évaluation des risques de cancer pour les humains est souvent basée sur des données animales expérimentales obtenues en fonction de différentes périodes d'exposition et souvent, de différentes voies d'exposition; ces périodes et ces voies d'exposition peuvent différer considérablement de celles qui sont propres aux humains. Par exemple, une exposition professionnelle aux pesticides se produit souvent à des concentrations relativement élevées, mais seulement quelques jours par année. Au contraire, les données animales sont d'habitude obtenues en fonction d'une exposition alimentaire quotidienne sur toute la durée de la vie. Dans les modèles de risque contemporains, on suppose que la dose quotidienne estimative relativement élevée basée sur une étude d'exposition à court terme se produira chaque jour (exposition non amortie) ou, au contraire, on fait la moyenne de la dose totale mesurée sur une courte période, que l'on applique à toute la durée de la vie (exposition amortie). Aucune de ces approches ne peut refléter exactement une exposition professionnelle propre aux pesticides.

La plupart des modèles mathématiques utilisés pour prévoir le risque de cancer supposent une exposition chronique et constante (Murdoch et Krewski, 1988). Souvent pourtant, cela n'est pas le cas; l'exposition peut varier selon la journée ou la saison et peut dépendre de facteurs variables. Krewski et Murdoch (1988) ont observé que, bien que certains modèles permettent de tenir compte de régimes de dosage variables, nombre d'entre eux ne font appel qu'à une dose moyenne pondérée dans le temps. Ces auteurs ont également montré que le risque prévu à partir d'un simple degré d'exposition moyen pondéré dans le temps ne peut représenter le risque réel correspondant à une exposition particulière variant dans le temps.

Pour illustrer l'incidence de la variation temporelle de l'exposition sur l'évaluation du risque global, prenons le cas du chlorure de méthylène. Il y a deux grandes voies de métabolisation du chlorure de méthylène. L'une d'elles, l'oxydase à fonctions mixtes (OFM), localisée dans le réticulum endoplasmique lisse des cellules, atteint la saturation à des doses relativement faibles (500 ppm

par inhalation chez les rats et les souris) (*U.S. Food and Drug Administration*, 1989) et présente une forte affinité pour le chlorure de méthylène tout en n'ayant qu'une faible capacité de le métaboliser (Elder, 1988). L'augmentation des doses de chlorure de méthylène ne stimule pas le métabolisme par cette voie. L'autre voie, celle de la glutathion-transférase, est située dans la fraction soluble du cytoplasme. Cette voie n'est pas saturable en présence de fortes doses de chlorure de méthylène, pour lequel elle présente une faible affinité et un pouvoir de métabolisation élevé (Elder, 1988); en conséquence, une augmentation des doses de chlorure de méthylène entraîne un accroissement du métabolisme par cette voie.

De nombreux scientifiques soutiennent que ce sont les intermédiaires produits par la glutathion-transférase qui causent le cancer chez la souris, et que ni le chlorure de méthylène comme tel, ni les intermédiaires de la voie OFM ne contribuent à la cancérogenèse. Si ces affirmations étaient vraies et pouvaient s'appliquer aux humains, il en découlerait qu'un faible degré d'exposition chronique n'entraînerait pas le cancer et que la voie OFM ne serait pas saturée. Par contre, lorsque des personnes seraient exposées à des doses très élevées de chlorure de méthylène, même sur une courte période, comme cela peut arriver en milieu professionnel, la voie OFM pourrait être saturée et faire entrer en jeu la glutathion-transférase, ce qui pourrait conduire à la cancérogénèse. Dans ce cas, si les fortes expositions observées en milieu de travail étaient mises en moyenne sur toute la durée de la vie, ce qui abaisserait par le fait même l'évaluation de l'exposition quotidienne, on se trouverait à sous-estimer le risque. Cela montre bien l'importance de bien connaître la durée et la fréquence prévues de l'exposition, de même que le métabolisme de la substance étudiée.

5.4.2 Extrapolation à de vastes populations

Comme la plupart des études de l'exposition professionnelle se font sur des échantillons de petite taille, leurs résultats doivent être extrapolés à une population cible importante et variable. Les groupes professionnels ont cependant l'avantage d'être mieux définis que l'ensemble de la population, ce qui permet de mieux comprendre les limites de l'extrapolation que dans le cas de l'évaluation d'une exposition touchant l'ensemble de la population. Les études d'évaluation de l'exposition aux polluants présents dans l'air ambiant intérieur ont montré qu'il était très difficile d'extrapoler les données d'un immeuble à un autre, la variabilité des paramètres propres à chaque immeuble pouvant influer sur l'exposition. Le problème est encore plus complexe lorsqu'il s'agit d'extrapoler des études effectuées dans une région du pays à une autre.

5.4.3 Populations à risque élevé

Deux sous-ensembles particuliers de la population sont souvent négligés dans les évaluations de l'exposition et du risque : les personnes qui présentent une sensibilité excessive à un composé particulier et celles qui sont plus exposées que d'autres à cause de paramètres d'exposition différents. Le premier de ces

sous-ensembles est constitué d'un groupe croissant de personnes très sensibles aux contaminants environnementaux et qui peuvent donc courir un risque supérieur à celui de l'ensemble de la population. Le deuxième groupe, qui comprend les enfants et les travailleurs industriels, peut être davantage exposé que les autres à cause de différences dans le mode de vie; ainsi, les membres de ce groupe peuvent être soumis à une plus forte exposition à cause du milieu dans lequel ils vivent, de leur lieu de travail, de leurs habitudes alimentaires et de leurs activités de loisir. Une évaluation du risque basée sur une personne type ne tient pas compte de ces deux groupes.

5.4.4 Assurance de la qualité

L'assurance de la qualité est un élément essentiel de toute évaluation scientifique. Bien qu'elle ne soit pas moins importante dans les études d'exposition, elle y est cependant particulièrement difficile à appliquer, ces études étant rarement effectuées dans un laboratoire contrôlé. En outre, comme les composés étudiés ne sont souvent présents qu'à de très faibles concentrations, le risque d'erreur attribuable aux difficultés mêmes de l'analyse est élevé.

5.4.5 Résumé – Limites globales de l'évaluation de l'exposition

L'évaluation de l'exposition dépend de nombreux facteurs et hypothèses, qui doivent être le mieux définis possible. Les estimations tiennent rarement compte de toutes les voies d'exposition possibles, en particulier de celles qui sont difficiles à contrôler. Par exemple, si l'on peut contrôler les voies cutanées et pulmonaires dans les études en milieu professionnel, il est rare que l'on y tienne compte de la voie orale (ingestion d'aliments contaminés ou de fumée de cigarette), ce qui risque de conduire à une sous-estimation du niveau réel d'exposition. De la même façon, lorsqu'on contrôle les polluants environnementaux, on ne tient habituellement compte que de la seule voie pulmonaire. De surcroît, une fois recueillies les données sur la quantité de substances chimiques déposées, données en elles-mêmes limitées, il reste à formuler une hypothèse sur la quantité absorbée par voie cutanée, pulmonaire ou orale.

La surveillance biologique, qui permet de mesurer les expositions par toutes les voies et d'évaluer la dose interne, est la meilleure solution à ce genre de problème. Malheureusement, on comprend rarement assez la pharmacocinétique de la substance étudiée pour arriver à interpréter les données de ce genre d'analyse. Les données sur les effets sur la santé utilisées dans l'évaluation du risque sont en outre ordinairement fondées sur des études animales où on n'a tenu compte que d'une seule voie d'exposition.

Pour évaluer l'exposition, il faut définir la population considérée – que l'on choisisse un scénario d'exposition «type» ou un scénario de la pire éventualité. Dans les deux cas, il faut poser une foule d'hypothèses relativement au poids corporel, à la durée de vie, au mode de vie et au temps de contact (p. ex., le nombre d'heures qu'un enfant peut jouer sur un tapis traité avec un composé

potentiellement cancérogène). Pour les évaluations fondées sur la modélisation, il faut faire des hypothèses sur les voies d'exposition, la transformation et l'évolution du produit considéré, et les populations à risque. Davis et Gusman (1982) ont constaté qu'il n'était guère utile de penser en termes de personnes «moyennes» et qu'il valait mieux résoudre les épineux problèmes posés, par exemple, par l'établissement de gammes d'expositions et de sensibilités individuelles. Selon eux, les scientifiques et les autorités responsables de la réglementation doivent admettre, même à contrecœur, que les données dans ce domaine sont par nature inexactes et habituellement hypothétiques.

Dans la plupart des cas, les évaluations de l'exposition ne portent que sur une seule substance. Dans la réalité toutefois, il est rare que l'exposition se limite à un seul contaminant environnemental. L'examen d'une seule substance isolée du milieu ne peut que donner une estimation partielle et probablement erronée du danger et, par conséquent, du risque. Ce problème n'est toutefois pas l'apanage de l'évaluation de l'exposition, car il est aussi rare de pouvoir étudier les effets toxicologiques découlant de l'exposition à plus d'une substance à la fois.

6. Interprétation et évaluation des données sur la cancérogenèse

Nous nous sommes concentrés jusqu'à présent sur trois facteurs importants pour l'identification et le contrôle des cancérogènes chimiques :

1. l'épidémiologie, qui donne des preuves directes qu'un agent quelconque est associé ou non au cancer chez les humains;

2. les bio-essais de cancérogenèse, que nous avons abordés brièvement, qui sont effectués d'habitude chez les rongeurs et qui donnent une preuve directe de la cancérogénicité ou de la non-cancérogénicité de la substance testée pour une ou plusieurs espèces de substitution, ainsi qu'une indication de sa cancérogénicité éventuelle pour les humains;

3. le degré probable ou réel d'exposition des humains, lorsque l'agent est une substance chimique présente dans l'environnement.

Nous examinerons dans le reste du texte les hypothèses qu'il faut poser pour utiliser ces informations ou élaborer des règlements sur les cancérogènes potentiels pour les humains dans l'environnement, et nous tenterons d'établir si ces hypothèses sont suffisamment justifiées du point de vue de la réglementation et du point de vue scientifique.

Par le passé, on a couramment supposé, comme on le fait encore très souvent aujourd'hui, qu'un agent qui s'est révélé cancérogène pour une ou plusieurs espèces animales de substitution peut l'être également pour les humains. Cette hypothèse prudente doit être remise en question à la lumière de l'étude effectuée par Haseman et Huff (1987) sur 266 produits chimiques testés sur des rats et des souris dans le cadre du programme de bio-essai du programme national de toxicologie américain (*U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program* (NCI/NTP)). Les deux espèces de rongeurs phylogénétiquement similaires (c'est-à-dire reliées génétiquement) utilisées dans cette étude n'ont en effet permis de prédire qu'un composé chimique cancérogène pour une espèce le serait pour l'autre que dans 74 p. 100 du nombre total d'exemples considérés. Cette analyse remet sérieusement en question la validité de la comparaison de ces espèces de rongeurs avec l'espèce humaine, phylogénétiquement différente, pour obtenir une indication de la cancérogénicité probable pour les humains d'une substance qui s'est révélée cancérogène pour les rats et les souris. Cette hypothèse est toutefois étayée en partie par la démonstration (Vainio et coll., 1985) que presque tous les agents considérés comme cancérogènes pour les humains d'après les études épidémiologiques (preuves «suffisantes» ou «limitées») sont également cancérogènes pour les espèces de substitution. Il n'existe cependant aucune preuve que les substances cancérogènes pour les animaux le sont presque toujours pour les humains.

La comparaison des effets cancérogènes de substances qui se sont révélées telles chez les animaux avec ceux auxquels on pourrait s'attendre chez les humains pose deux grands types de problèmes. Le premier a trait à la façon dont l'espèce et l'agent testés interagissent. Le deuxième tient au fait que les humains sont habituellement exposés à des concentrations beaucoup plus faibles de l'agent testé que ne le sont les animaux d'expérience, traités avec la dose maximum tolérée (DMT) et des fractions de cette dose (voir la section 4.2.4). Parmi ces problèmes, figure la nécessité d'extrapoler à de faibles doses les résultats obtenus avec de fortes doses.

La façon classique d'aborder le premier type de problèmes est de supposer, à moins que des données existent à l'effet du contraire, que la réponse des humains à un agent sera du même ordre de grandeur que celle de l'espèce expérimentale la plus sensible. Les données obtenues pour cette espèce servent à calculer, encore une fois à l'aide d'hypothèses, l'éventuelle réponse humaine aux expositions réelles ou perçues au cancérogène animal étudié. Comme le nombre de cancérogènes identifiés chez les animaux par suite des bio-essais de cancérogenèse ne cesse cependant de croître, il faudra améliorer de plus en plus les méthodes d'évaluation des effets de ces substances à des fins de réglementation.

6.1 Approche classique de l'évaluation des dangers que présentent les cancérogènes animaux pour les humains

6.1.1 Considérations générales

La méthode classique d'identification et de classification des cancérogènes humains à partir de bio-essais effectués sur des animaux a été adoptée par le Centre international de recherche sur le cancer, qui l'utilise dans ses monographies sur l'évaluation des risques cancérogènes que présentent les produits chimiques pour les humains (CIRC, 1982-1987). Ces monographies constituent d'excellentes analyses scientifiques en profondeur de chaque bio-essai effectué sur le produit chimique considéré. On y fait état des propriétés physiques et chimiques de l'agent, de sa production, de ses occurrences et de son utilisation, des données épidémiologies (le cas échéant), et des autres données biologiques pertinentes, dont la génotoxicité, le métabolisme et parfois la toxicité. Ces évaluations n'étaient toutefois jusqu'à présent basées que sur les données sur la cancérogénicité malgré l'existence d'autres données. Le Centre international de recherche sur le cancer commence aujourd'hui à tenir compte des considérations d'ordre mécaniste.

6.1.2 Dose, pharmacocinétique et métabolisme des cancérogènes qui interagissent avec l'ADN et forme de la courbe dose-réponse

Il est fort avantageux de connaître la forme de la courbe dose-réponse pour l'interprétation et la réglementation des phénomènes toxiques. Ces courbes dose-réponse sont particulièrement précieuses lorsqu'on se sert du niveau et de l'identité de la dose chimique qui atteint réellement la cible plutôt que du degré d'exposition globale de l'animal testé. Pour la cancérogenèse, comme c'est le cas pour de nombreux autres processus toxiques, il est essentiellement impossible de déterminer la forme de la partie inférieure de la courbe dose-réponse. En effet, il faudrait pour cela utiliser un nombre si élevé d'animaux que même les pays les plus riches ne pourraient pas se le permettre. De surcroît, la courbe dose-réponse d'un produit chimique ne pourrait probablement pas s'appliquer à un autre produit plus ou moins étroitement apparenté, les mécanismes de la cancérogenèse étant à ce point complexes que des différences, même légères, peuvent se traduire par d'énormes variations dans les courbes dose-réponse.

C'est pourquoi, en pratique, on suppose prudemment que la partie inférieure de la courbe dose-réponse est linéaire. Cette supposition ne repose cependant sur aucune donnée expérimentale; par exemple, l'expérience «méga», qui portait sur plus de 23 000 souris en vue de déterminer la forme de la courbe dose-réponse pour le cancérogène expérimental connu N-2-acétylaminofluorène jusqu'à un niveau d'induction tumorale de 1 p. 100, a donné deux formes distinctes de courbes. Il est en effet apparu que la forme de la courbe dose-réponse était presque linéaire pour les tumeurs du foie tandis que, pour les tumeurs de la vessie, après avoir indiqué une incidence extrêmement limitée à faible dose, elle grimpait ensuite en flèche (Staffa et Mehlman, 1979). Les analyses statistiques de ces données n'ont pas permis d'établir la forme de la courbe dose-réponse en-deçà du seuil de risque de 1 p. 100. Brown et Hoel (1983) ont montré que le rapport dose-réponse apparemment linéaire des tumeurs du foie n'était pas incompatible avec un seuil à faibles doses; Gaylor et coll. (1985) ont soutenu que l'existence d'une tendance linéaire en-deçà du seuil apparent pour l'induction de tumeurs de la vessie ne pouvait être écartée.

Ces obstacles pratiques qui s'opposent à la détermination de la partie inférieure de la courbe dose-réponse sont encore accrus du fait que la cancérogenèse est un événement stochastique, c'est-à-dire qu'elle affecte certains individus d'une population sans apparemment affecter les autres. Cette constatation, alliée à la différence des sensibilités selon les individus dans chaque population, rend impossible, du point de vue mathématique, la démonstration de tout seuil ou degré d'exposition sans effet, et augmente encore le degré d'incertitude en ce qui concerne le risque posé par une exposition à de faibles doses de cancérogènes. C'est pourquoi certains organismes décident, ou sont légalement tenus, de présumer qu'il n'y a aucun niveau acceptable d'exposition pour les cancérogènes, ou de faire appel à des techniques mathématiques d'extrapolation peu fondées sur le plan biologique. Un certain nombre de projets de recherche cherchent aujourd'hui à résoudre ce problème.

La raison pour laquelle les études pharmacocinétiques physiologiques ne sont pas toujours d'une grande utilité pour déterminer la forme de la courbe dose-réponse tient à ce que de nombreux cancérogènes administrés n'interagissent pas directement avec le tissu cible. En effet, les cancérogènes ont besoin d'être activés par un ou plusieurs des systèmes enzymatiques normalement chargés de la détoxification et de la clairance des agents testés. À cause de leur instabilité, ces dérivés actifs ne peuvent être extraits des tissus et analysés de façon adéquate, notamment lorsqu'ils y sont présents à de très faibles concentrations. On a montré en outre, dans le cas de certains cancérogènes, comme le N-2-acétylaminofluorène, qu'il existe plus d'un produit actif, même chez une même souche et une même espèce d'animale de laboratoire. Pendant un certain temps, on a cru que la tâche de détoxifier et d'éliminer les substances chimiques étrangères revenait avant tout au foie. Mais on a montré depuis que différents tissus chez une même espèce sont, à divers degrés, capables de métaboliser les composés chimiques étrangers. Les cellules de la paroi intérieure de la vessie, par exemple, sont aussi capables d'activer les cancérogènes que les cellules hépatiques.

On peut vraisemblablement soutenir (voir section 6.2) que, dans le cas des cancérogènes génotoxiques, les produits actifs dont il vient d'être question interagissent avec l'ADN cellulaire pour former des produits d'addition de l'ADN qui jouent un rôle important dans l'induction du cancer. Une foule de données sérieuses montrent que ces dérivés d'ADN sont effectivement formés par de nombreux types différents de cancérogènes, dont certains hydrocarbures aromatiques polycycliques, certaines amines aromatiques, certains composés N-nitroso et certaines aflatoxines. Les techniques actuelles permettent d'analyser quantitativement les différents types de produits d'addition présents dans l'ADN et ont démontré que certains de ces produits pourraient jouer un rôle plus important que d'autres dans le processus de cancérogenèse. En outre, les techniques de biologie moléculaire, telles que le postmarquage de l'ADN (une méthode qui permet de fixer un marqueur hautement radioactif à des fragments précis d'ADN), pourraient permettre de déceler la formation même d'un petit nombre de produits d'addition ou d'autres dommages causés à l'ADN par de très faibles concentrations de métabolites activés. Cette approche devrait éventuellement faire progresser les recherches sur la partie inférieure de la courbe dose-réponse (Hoel et coll., 1983; Lutz, 1990).

Dans l'ensemble, il est donc évident que de nombreux problèmes restent à résoudre avant qu'il ne soit possible de déterminer avec précision la forme de la courbe dose-réponse des cancérogènes. En attendant, il faut faire des hypothèses au sujet de cette courbe pour évaluer la réponse probable des humains à de faibles concentrations de cancérogènes environnementaux capables d'interagir avec l'ADN cellulaire.

6.1.3 Facteurs quantitatifs de l'évaluation des risques de cancérogenèse

6.1.3.1 Modèles mathématiques de la cancérogenèse

Pour faire la description quantitative des processus néoplasiques, il faut disposer d'un modèle mathématique de la cancérogenèse. Le modèle à étapes multiples est utilisé depuis longtemps dans les descriptions théoriques de la cancérogenèse (Wittemore et Keller, 1978; Brown et Kozio, 1983; Armitage, 1985). Comme l'ont décrit Armitage et Doll (1961), une cellule souche doit passer par une série de mutations avant de donner naissance à une cellule cancéreuse maligne. Ce modèle prévoit que les taux d'incidence du cancer selon l'âge devraient augmenter proportionnellement à l'âge de la personne portée à une puissance reliée au nombre d'étapes du modèle, et donne une bonne description de nombreuses formes de cancers humains en prévoyant un nombre d'étapes variant de deux à six.

Moolgavkar et coll. (1986a, 1986b) et Moolgavkar et Luebeck (1990) ont examiné un modèle biologique de la cancérogenèse basé sur l'hypothèse selon laquelle une tumeur peut être initiée après qu'un dommage génétique ait été causé à une ou plusieurs cellules dans le tissu cible par une exposition à un initiateur. Ces cellules initiées peuvent ensuite subir une transformation maligne et donner lieu à une lésion cancéreuse. La fréquence de ce genre de lésion peut être accrue par l'exposition subséquente à un promoteur, qui vient accroître le pool de cellules initiées par divers mécanismes qui provoquent une expansion clonale.

Les formulations mathématiques de ce processus ont été établies par Moolgavkar et coll. (1988) et Greenfield et coll. (1984). Ce modèle stochastique naissance-mort-mutation pose comme hypothèse que deux mutations, dont chacune a lieu au moment de la division cellulaire, sont nécessaires pour qu'une cellule normale devienne maligne. L'activité d'initiation peut être quantifiée en fonction du taux de survenue de la première mutation. Le taux de survenue de la deuxième mutation donne une idée de l'évolution vers une lésion cancéreuse entièrement différenciée. L'activité de promotion est mesurée par la différence entre les taux de naissance et de mortalité des cellules initiées. En l'absence d'effets de promotion et de variabilité dans le pool des cellules normales, le modèle naissance-mort-mutation en deux étapes se réduit au modèle classique en deux étapes.

Le modèle naissance-mort-mutation offre un contexte commode pour décrire quantitativement les mécanismes d'initiation ou de promotion de la cancérogenèse (Thorslund et coll., 1987). Un initiateur est une substance qui augmente le taux de survenue de la première mutation, tandis qu'un promoteur accroît le pool des cellules initiées. Le terme «progresseur» a été utilisé pour décrire un agent qui augmente le taux de survenue de la deuxième mutation, qui entraîne à son tour la transformation maligne en une cellule cancéreuse

(*U.S. Environmental Protection Agency*, 1987a). Il se pourrait que ce soit le même agent qui augmente le taux de survenue des deux mutations et qui favorise ainsi autant l'initiation que la progression.

Thorslund et Charnley (1988) se sont servis récemment du modèle en deux étapes pour évaluer les risques de cancer associés à une exposition à la dioxine et au chlordane, deux présumés agents de promotion tumorale. Ce modèle concordait bien avec les données des bio-essais sur ces deux composés en laboratoire et a donc facilité la description quantitative du mécanisme de la cancérisation dans le cadre du modèle en deux étapes. En faisant appel soit à un modèle exponentiel simple, soit à un modèle logistique pour décrire la relation dose-réponse pour la promotion, cette analyse a donné des estimations du risque passablement inférieures à celles qui étaient basées sur le modèle linéarisé à étapes multiples. Toutefois, avant de pouvoir recommander l'application systématique de ce modèle, il faudra en étudier davantage les propriétés statistiques, notamment en ce qui a trait aux prévisions du risque à faible dose (Portier, 1987).

6.1.3.2 Pouvoir cancérogène

Un certain nombre d'indices numériques ont été proposés pour décrire le pouvoir des cancérogènes chimiques (Barr, 1985). Gold et coll. (1984) ont tabulé la DT_{50} d'un grand nombre de cancérogènes chimiques à partir des résultats d'études de cancérogénicité en laboratoire, rendant par là cet indice fort populaire. En principe, la DT_{50} est définie comme la dose qui réduit de 50 p. 100 la proportion d'animaux exempts de tumeurs (Peto et coll., 1984; Sawyer et coll., 1984). La DT_{50} des cancérogènes chimiques peut varier de plus de six ordres de grandeur, ce qui témoigne de différences énormes dans leur pouvoir cancérogène (Krewski et coll., 1990a).

On a observé une certaine corrélation entre la DT_{50} et la DL_{50} dont on se sert pour mesurer la toxicité aiguë (Zeise et coll., 1984, 1986), bien que le degré de cette corrélation soit limité (Metzger et coll., 1989). La DT_{50} est également corrélée à la dose maximale tolérable (DMT), généralement utilisée comme dose élevée dans les bio-essais de cancérogenèse (Bernstein et coll., 1985). Le peu de corrélation qu'il semble y avoir entre la DT_{50} et les indicateurs biologiques de pathologie tumorale (Gold et coll., 1986) donne à penser qu'il est impossible de résumer en un seul indice les caractéristiques d'un cancérogène chimique (Wartenberg et Gallo, 1990).

Les corrélations entre les TD_{50}, les DL_{50} et les DMT doivent être interprétées avec prudence (Crouch et coll., 1987). Comme la gamme des valeurs possibles de DT_{50} est limitée par le choix de la DMT, la variation importante du pouvoir cancérogène des différentes substances chimiques ne peut que donner lieu à une corrélation entre ces deux indices (Bernstein et coll., 1985). À cet égard, Rieth et Starr (1989) ont noté qu'il n'y avait guère de corrélation entre la DT_{50} et la DMT après normalisation des valeurs de DT_{50} en fonction de la DMT. Les mêmes

auteurs (1989) croient également que la corrélation entre la DL_{50} et la DT_{50} pourrait se manifester parce que cette dernière recouvre souvent une importante proportion de la DL_{50}.

6.1.3.3 Évaluation du risque à faibles doses

Bien que la DT_{50} puisse avoir une certaine utilité pour représenter la puissance globale des substances cancérogènes, elle n'indique cependant pas nécessairement le degré de risque posé par de faibles degrés d'exposition (Wartenberg et Gallo, 1990). On évalue généralement le risque à faibles doses en extrapolant les résultats obtenus à des doses plus élevées, proches de la DT_{50}. Bien que le choix du modèle dose-réponse utilisé pour l'extrapolation puisse avoir un effet marqué sur l'évaluation de ce risque (Krewski et Van Ryzin, 1981), les différences qui en découlent sont minimes si l'on s'en tient aux modèles qui sont linéaires dans la zone de faibles doses. L'hypothèse de la linéarité des faibles doses de cancérogènes chimiques qui entrent en interaction directe avec le matériel génétique est étayée aussi bien par les considérations théoriques sur la cancérogénèse (Krewski et coll., 1991) que par la linéarité de la liaison de l'ADN observée à faibles doses pour un certain nombre de cancérogènes chimiques (Lutz, 1990). Bien qu'elle ne puisse s'appliquer aux cas de cancérogénèse consécutive à une atteinte des tissus par une substance toxique, l'hypothèse de la linéarité des faibles doses est souvent adoptée dans l'évaluation du risque à faibles doses à des fins de réglementation, en l'absence d'information probante à l'effet du contraire (*Office Science and Technology Policy*, 1985).

L'Agence américaine de protection de l'environnement (*U.S. Environmental Protection Agency*, 1986) a recours au modèle linéarisé à étapes multiples pour évaluer le risque à faibles doses. Il faut pour cela définir une limite de confiance supérieure q_1^* pour le terme linéaire du modèle (Crump, 1984). La valeur de q_1^* représente la pente de la courbe dose-réponse dans le secteur de faibles doses et équivaut au risque associé à une unité de mesure de la dose (telle que 1 mg/kg par jour). L'agence américaine n'utilise qu'une limite de confiance supérieure pour la pente des faibles doses, en faisant valoir que l'estimation de la probabilité maximale de ce paramètre est hautement instable. La valeur de q_1^* dérivée du modèle à étapes multiples est corrélée négativement avec la DT_{50} (Krewski et coll., 1989). Ainsi, les composés à pouvoir cancérogène élevé ayant une faible DT_{50} seront généralement associés à des degrés de risque plus élevé à faibles doses que d'autres composés dotés d'une DT_{50} élevée.

Comme le modèle à étapes multiples ne permet pas de rendre compte de la croissance tissulaire et de la cinétique cellulaire, qui sont reconnus comme étant des déterminants potentiellement importants de la cancérogénèse dans le modèle à deux étapes naissance-mort-mutation, il se pourrait que la description qu'il donne de la cancérogénèse soit incomplète dans certains cas. Il n'est guère probable, en outre, qu'un modèle mathématique simple puisse fournir une base universellement satisfaisante pour décrire tous les mécanismes possibles du développement néoplasique. C'est d'ailleurs pourquoi Krewski et coll. (1990b)

ont proposé une méthode d'extrapolation ne faisant appel à aucun modèle d'évaluation des risques de cancer à faibles doses, et qui suppose seulement que la courbe dose-réponse est linéaire à faibles doses. Les évaluations des pentes de faibles doses basées sur l'extrapolation sans modèle se rapprochent généralement de celles qui sont basées sur le modèle linéarisé à étapes multiples.

6.1.3.4 Pharmacocinétique

De nombreux cancérogènes chimiques ont besoin d'une forme quelconque d'activation métabolique pour avoir un effet. Les modèles pharmacocinétiques pourraient donc servir à décrire la captation, l'absorption, la distribution et l'élimination des xénobiotiques (O'Flaherty, 1981). En retour, cela permettrait d'évaluer la quantité de métabolites réactifs qui atteignent le tissu cible. La dosimétrie tissulaire est fort utile pour évaluer le risque dans les cas où une ou plusieurs étapes du processus d'activation métabolique sont saturables, car il peut alors y avoir une relation non linéaire entre la dose du composé mère administré au sujet testé et la dose de métabolite réactif qui atteint un tissu cible (Hoel et coll., 1983).

Les modèles pharmacocinétiques compartimentaux ont été largement utilisés par le passé pour décrire les systèmes biologiques en fonction d'un petit nombre de compartiments théoriques (Godfrey, 1983). Dernièrement, divers modèles pharmacocinétiques physiologiques, dans lesquels l'organisme est représenté par un grand nombre de compartiments physiologiquement significatifs, ont été utilisés pour décrire le processus de l'activation métabolique (Menzel 1987; Reitz, 1990). En pratique, l'application de ces modèles pharmacocinétiques physiologiques exige une connaissance approfondie de l'anatomie et de la physiologie des animaux soumis aux essais, de la solubilité du produit soumis à l'essai dans les divers organes et tissus, et des paramètres biochimiques qui régissent le métabolisme (Andersen et coll., 1987).

La caractérisation adéquate de l'activation métabolique à l'aide d'un modèle pharmacocinétique convenable permet d'utiliser la dose qui atteint le tissu cible au lieu de la dose d'administrée dans la modélisation de la relation dose-réponse. Normalement, cela devrait conduire à de meilleures prévisions du risque cancérogène (Krewski et coll., 1987), mais ce n'est pas toujours le cas, compte tenu de l'incertitude associée aux nombreux paramètres qui entrent en ligne de compte dans ces modèles (Portier et Kaplan, 1989).

6.1.3.5 Conversion d'une espèce à l'autre

Idéalement, l'extrapolation quantitative des risques de cancérogénèse d'une espèce à une autre devrait tenir compte des différences connues entre ces espèces. Dans le passé, l'équivalence de doses entre espèces était basée sur le poids corporel. Il est cependant apparu que de nombreuses constantes physiologiques (p. ex., la consommation d'eau, de nourriture et d'oxygène) variaient comme une fonction de puissance du poids corporel (Linstedt, 1987). Comme le soulignent

Dourson et Stara (1983), certaines données laissent croire que le taux métabolique et la toxicité de nombreux composés pourraient être reliés avec plus de précision à la surface corporelle plutôt qu'au poids corporel (Pinkel, 1958; Freireich et coll., 1966). L'activité des médicaments chez les nourrissons et les nouveau-nés humains a également été reliée à la surface corporelle (Wagner, 1971; Homan, 1972).

Le recours à une fonction de puissance générale du poids corporel pour la conversion entre espèces comprend la conversion du poids corporel à titre de cas spécial doté d'une puissance égale à un (Krewski et coll., 1990b). Comme la surface corporelle varie à peu près à raison d'une puissance 2/3 du poids corporel, la conversion de la surface représente un autre cas spécial de l'équation de la loi générale de la puissance. Précisément, cela signifie que lorsque la toxicité chez différentes espèces est proportionnelle à la surface plutôt qu'au poids corporel, la dose par unité de poids corporel qui produit un effet donné diminuera à raison de la puissance 1/3 du poids corporel. En se fondant sur une nouvelle analyse des données utilisées par Freireich et coll., (1966), Travis et White (1988) ont laissé entendre qu'il conviendrait peut-être davantage d'utiliser un poids corporel à la puissance 3/4 plutôt que 2/3 pour la conversion entre espèces.

6.2 Mécanismes de la cancérogenèse

Nous avons déjà fait mention d'une éventuelle séparation en deux ou plusieurs grandes étapes du processus de la cancérogénèse par agents chimiques (voir sections 1.3 et 4.2.9.2). Les notions d'initiation et de promotion ont été appliquées avec succès à l'induction du cancer dans plusieurs tissus, notamment dans la peau de souris, sur lesquels la plupart des premiers travaux ont été effectués. Du point de vue mécaniste, on en sait cependant beaucoup plus sur le fonctionnement de l'initiation que sur celui de la promotion.

6.2.1 Mécanisme de la cancérogenèse génotoxique

Le processus de l'initiation cancéreuse comporte la conversion de cellules apparemment normales d'un tissu en cellules qui, dans les circonstances appropriées, évoluent en cellules tumorales et en cancer proprement dit. Il apparaît de plus en plus que ce changement est provoqué par une mutation induite chimiquement ou par un autre mécanisme génotoxique de la substance chimique initiatrice. Il se pourrait par ailleurs que l'initiation entraîne une altération de l'information génétique dans la cellule cible, comme le donne fortement à penser la démonstration que de nombreux cancérogènes chimiques spécifiques interagissent chimiquement avec l'ADN, qui code l'information génétique régissant la cellule, ou l'endommagent d'une quelque autre façon (Swenberg et coll., 1990). L'anomalie génétique observée chez certains patients atteints de xeroderma pigmentosum, qui fait que ceux-ci sont incapables de réparer leur ADN cutané endommagé par la lumière du soleil ou d'autres radiations

ultraviolettes, vient renforcer encore cette hypothèse. L'incidence de diverses lésions, allant de l'érythème aux cancers multiples de la peau, est beaucoup plus élevée chez ces personnes que chez les sujets non atteints.

Le fait que les essais de génotoxicité *in vitro* de certains mutagènes chimiques permettent assez bien de détecter les cancérogènes appartenant à certaines classes de produits chimiques vient de la même façon étayer l'hypothèse d'une corrélation entre l'initialisation et la génotoxicité. La découverte récente que de nombreuses tumeurs, tant chez les humains que chez les animaux, contiennent des gènes communs activés par des gènes spécifiques présents dans le génome de la cellule normale témoigne en effet grandement en faveur de l'intervention d'un événement génétique dans l'initiation cancéreuse. Les gènes spécifiques aux tumeurs, appelés oncogènes (ou gènes suppresseurs) (Klein et Klein, 1984; Barbacid, 1986; Ramel, 1986; Klein, 1987), semblent être dérivés de séquences d'ADN semblables, mais non tout à fait identiques, que l'on trouve dans les tissus normaux et que l'on a appelés proto-oncogènes. Parmi les événements génétiques qui entrent en jeu dans l'activation des proto-oncogènes, figurent la mutation d'une seule base dans la séquence d'ADN (mutation ponctuelle), la transposition du proto-oncogène dans un site préféré du génome, et l'élimination d'une partie de la séquence d'ADN.

Certaines données montrant qu'une attaque chimique de l'ADN cellulaire n'est pas, comme on le croyait auparavant, totalement aléatoire commence à se faire jour. Il apparaît aujourd'hui que l'agent initiateur non seulement attaque une ou plusieurs bases spécifiques de l'ADN (p. ex., la guanine), mais qu'il attaque aussi ces bases spécifiques en fonction de leur position dans une séquence définissable de bases (Dolan et coll., 1988). L'importance de cette découverte récente et de la spécificité qui semble associée à l'activation des proto-oncogènes reste encore à étudier du point de vue de l'influence que cela peut avoir sur la spécificité de cancérogènes particuliers pour un tissu et pour une espèce. Les résultats de ces études pourraient faire grandement avancer notre compréhension des raisons pour lesquelles certaines espèces et certains tissus affichent une réponse étonnamment forte ou étonnamment faible à certains cancérogènes.

Du point de vue pratique, le processus de l'initiation peut être considéré comme un mélange de trois phénomènes successifs de compétition. Une première compétition a lieu entre les processus qui activent le cancérogène et ceux qui détoxifient soit le cancérogène lui-même, soit ses produits activés. Certains cancérogènes, que l'on appelle collectivement les agents biologiques alkylants ou arylants, ont le pouvoir chimique de se convertir spontanément en intermédiaires actifs. Une deuxième compétition se joue dans ce cas entre, d'une part, le taux de formation d'intermédiaires actifs et, d'autre part, le taux d'inactivation du cancérogène et de ses produits actifs. Enfin, comme la majorité des cancérogènes ont besoin d'être activés métaboliquement pour être transformés en intermédiaires actifs, une troisième compétition a lieu entre le taux de production enzymatique de l'intermédiaire et la détoxification de l'intermédiaire ou de la substance chimique administrée. De nombreuses expériences ont clairement démontré que la modification des taux d'enzymes métaboliques – par exemple, par des agents

qui «induisent» une élévation des taux de certaines de ces enzymes, mais non de toutes – a un effet marqué sur le nombre de tumeurs induites par une concentration particulière d'un cancérogène (Wattenberg, 1978).

L'intermédiaire actif, issu de la première compétition, peut réagir avec de nombreuses entités biologiques du tissu, dont les protéines, l'acide ribonucléique, les polysaccharides et des molécules plus simples comme l'eau, le glutathion et ainsi de suite. La deuxième compétition se fait donc entre les présumées cibles critiques dans l'ADN et les autres cibles pour les intermédiaires actifs. La probabilité d'interaction de l'intermédiaire actif avec les sites critiques sur l'ADN dépend (i) de la concentration des autres cibles, (ii) du milieu à travers lequel l'entité active doit passer pour atteindre la cible critique, (iii) de la présence de barrières biologiques, comme le placenta, et (iv) de la réactivité innée de l'entité active, qui détermine la facilité de la réaction aussi bien avec les cibles «de rechange», qu'avec les cibles critiques de l'ADN.

Plusieurs expériences critiques ont démontré qu'une augmentation marquée du nombre de cibles de rechange dans les tissus peut parfois réduire le potentiel cancérogène d'un agent. Le rôle important que joue la distance à franchir par l'agent est démontrée par l'incapacité des tissus fœtaux de rongeurs d'activer métaboliquement un certain nombre de cancérogènes (Juchau et Harris, 1990) et par l'absence de tumorisation qui s'ensuit lorsque ces tissus sont exposés *in utero* à un cancérogène. Ce phénomène s'explique par la trop grande instabilité de l'intermédiaire activé, lequel ne peut passer des tissus maternels aux tissus fœtaux à travers la barrière placentaire (Clayson, 1982). Une foule d'intermédiaires actifs différents pourraient se former au cours des réactions chimiques, mais la plupart de ces présumés intermédiaires sont trop réactifs pour quitter le site même de la réaction chimique et ne peuvent donc jouer aucun rôle dans la cancérogenèse *in vivo* (Clayson, 1987).

Les complexes chimiques formés entre l'ADN et les cancérogènes activés ne sont pas en soi des lésions génétiques. Leur conversion en lésions génétiques, phénomène nommé «fixation», dépend en effet d'un autre événement. Dans la plupart des cellules humaines et animales, il existe des systèmes capables de réparer l'ADN endommagé et de le ramener exactement à son état normal. Ces systèmes de réparation de l'ADN entrent en compétition avec les processus de réplication de l'ADN qui sont «sujets à erreur» lorsque des lésions ou des produits d'addition sont présents dans la réplication de l'ADN. Ces erreurs donnent lieu à de vraies lésions génétiques.

6.2.2 Aspects mécanistes de la promotion ou de l'évolution du cancer

On comprend beaucoup moins bien comment les cellules initiées, dont nous avons parlé dans la section précédente, peuvent évoluer en cancer. Nous ne traiterons dans ce qui suit que d'une seule approche de ce domaine complexe,

mais qui semble concorder avec les faits dont nous disposons à l'heure actuelle. Cela ne veut toutefois pas dire qu'elle ne devra pas être modifiée à la lumière des nouvelles données scientifiques.

Il semble que le développement tumoral dans la peau de souris initiée se fasse en deux phases, appelées «conversion» et «promotion» (Kinzel et coll., 1986). En effet, en badigeonnant deux produits chimiques l'un après l'autre sur de la peau de souris initiée, on a démontré que chacun de ces traitements, appliqué seul, n'accélérait pas de façon marquée le développement tumoral, alors que combinés, leur effet était plus marqué. Sur la peau de souris, le traitement de conversion est efficace même s'il est administré plusieurs semaines avant l'agent initiateur, sans que l'on sache pourquoi. Des chercheurs qui mènent des études semblables sur d'autres tissus cherchent à trouver d'autres paires de produits chimiques capables d'induire respectivement la conversion et la promotion.

Du point de vue biologique, les cellules initiées ne devraient guère se prêter à une division cellulaire propice à la formation de tumeurs grâce au phénomène de collaboration de cellule à cellule (Yotti et coll., 1979). Ce mécanisme de collaboration permet aux cellules d'échanger au besoin des éléments nutritifs essentiels ou d'autres molécules. Il arrive, pour plusieurs raisons, que cette collaboration cellulaire ne puisse plus faire obstacle à la division cellulaire et que celle-ci ait effectivement lieu. Les cellules initiées peuvent, par exemple, être assez vigoureuses pour annuler les effets inhibiteurs de la collaboration intercellulaire et induire un cancer proprement dit sans intervention. Un traitement continu au cancérogène peut encore provoquer la mort des cellules et leur régénération subséquente, favorisant ainsi la division et la croissance des cellules initiées. Le rythme normal de remplacement et de croissance cellulaire du tissu peut permettre aux cellules initiées de se développer. Enfin, l'utilisation d'un agent promoteur du cancer peut accélérer la division des cellules initiées et le développement tumoral (p. ex., Kinzel et coll., 1986).

Cette analyse des conditions de développement des tumeurs donne à penser qu'il existe plus d'un mécanisme de développement ou de promotion tumorale. Pour déterminer de quelle façon agissent les agents promoteurs du cancer, il faudra donc fort probablement étudier toute une série de mécanismes différents, produit chimique par produit chimique ou tissu par tissu, et décider lequel convient le mieux à un cas particulier.

6.2.3 Cancérogènes génotoxiques et non génotoxiques

En se basant sur l'actuelle définition opérationnelle du terme «cancérogène», soit un agent qui augmente le nombre de tumeurs malignes dans une population (voir section 1.3), nombre d'agents qui n'ont pas le pouvoir de provoquer chacune des étapes mécanistes de la cancérogenèse énumérées dans les sections précédentes peuvent être considérés comme cancérogènes potentiels pour les humains ou cancérogènes pour les animaux. Par exemple, si, comme cela semble probable, des populations humaines et animales sont exposées, dans leur régime alimentaire, à divers cancérogènes naturels capables d'initier la cancérogenèse, on

pourrait concevoir que les agents qui provoquent (i) une augmentation des concentrations de métabolites actifs par l'altération du taux des enzymes métabolisantes, ou (ii) une diminution de la quantité des cibles de rechange pour les métabolistes actifs dans les tissus, ou (iii) une diminution de la capacité de réparation de l'ADN, ou (iv) une accélération de la prolifération cellulaire dans les tissus affectés, soient capables d'accélérer l'induction de tumeurs dans les cellules initiées et soient, par conséquent, des cancérogènes complets (initiateurs et promoteurs). De surcroît, des cellules initiées peuvent se trouver dans les tissus par suite d'une exposition à des cancérogènes d'origine naturelle ou à des virus oncogènes tels que les virus de la leucémie humaine (HLTV I, II ou III), ou encore par suite d'une exposition accidentelle à des radiations ionisantes et, encore une fois, amener les chercheurs à considérer des agents promoteurs du cancer comme des cancérogènes complets à cause des conditions du bio-essai.

Ces agents n'ont pas de réponses positives aux tests *in vitro* ou *in vivo* de génotoxicité et ont été définis comme des cancérogènes non génotoxiques. Le produit pharmaceutique salbutamol par exemple, qui est un stimulant bêta-adrénergique utilisé dans le traitement de l'asthme bronchique, est non génotoxique. Il provoque l'apparition de léiomyomes mésovariens chez les rats, mais non chez les souris ou les hamsters. D'après les données expérimentales, il semble que, dans ce cas particulier, l'observation d'une induction tumorale n'ait guère de pertinence pour les humains. En effet, il a été montré que l'induction des tumeurs était imputable aux fortes teneurs de l'agent, qui provoquaient un relâchement continu des tissus musculaires et, par conséquent, favorisaient la prolifération des cellules musculaires.

Ashby et Tennant (1988) ont comparé les résultats obtenus avec 222 produits chimiques dans le cadre du programme de bio-essai NCI/NTP à ceux des déterminations structure-activité et de l'essai Ames *Salmonella*/microsome à titre d'exemple de test typique et bien établi de génétoxicité *in vitro*. Ils ont ainsi relevé un degré de corrélation plus élevé entre les substances chimiques qui possédaient une structure chimique analogue à celle de cancérogènes et l'essai de *Salmonella* qu'entre le test *in vitro* et les résultats du bio-essai de cancérogenèse. Cela pourrait être dû en grande partie à la sensibilité beaucoup plus prononcée du test *in vitro* comparativement au bio-essai de cancérogèse chez les rongeurs Douglas et coll. (1988). L'importance de la distorsion du métabolisme qui favorise l'activation métabolique, de la diminution artificielle de la capacité de réparation de l'ADN, et de plusieurs autres facteurs qui contribuent chacun à augmenter la sensibilité des tests *in vitro*, a d'ailleurs été soulignée par Douglas et coll. en 1988.

Ashby et Tennant (1988) ont relevé deux grands profils tumoraux :

1. Les cancérogènes génotoxiques, mais non les cancérogènes non génotoxiques, sont efficaces dans un groupe d'environ 26 tissus, dont l'estomac, les glandes de Zymbal (conduits auditifs), les tissus sous-cutanés et l'appareil circulatoire.

2. Les deux types de cancérogènes, génotoxiques et non génotoxiques, ont été tous deux efficaces dans les 13 autres tissus examinés, notamment dans le foie de souris, qui représentait 24 p. 100 de toutes les observations de tumeurs dans cette série.

En outre, il est apparu que les cancérogènes non génotoxiques induisaient des types uniques de tumeurs chez des espèces uniques beaucoup plus fréquemment que ne le faisaient les cancérogènes génotoxiques.

Ces observations donnent à penser que les cancérogènes génotoxiques ont un pouvoir plus étendu et plus grand d'induire le cancer que les cancérogènes non génotoxiques. Cela ne suffit certes pas pour affirmer que les cancérogènes non génotoxiques sont peu susceptibles d'avoir un effet sur les humains. L'amiante, par exemple, un cancérogène humain officiellement non génotoxique, a, par le biais de mécanismes inconnus, causé le cancer du poumon et des mésothéliomes (tumeurs des muqueuses) de la plèvre et du péritoine chez les hommes et les femmes qui y ont été exposés dans leur milieu de travail (Selikoff et Lee, 1978).

S'il ne semble faire aucun doute que les cancérogènes génotoxiques – c'est-à-dire les agents qui s'avèrent cancérogènes dans les bio-essais sur les rongeurs et qui donnent des résultats positifs dans une série de tests de génotoxicité – ont le pouvoir d'induire le cancer à partir d'un certain niveau chez les humains exposés, on pourrait par contre démontrer, dans certains cas précis, que les cancérogènes non génotoxiques sont peu susceptibles d'avoir des effets sur les humains. Mais pour cela, deux types d'études doivent d'abord absolument être effectués. Il faut en premier lieu réaliser d'autres tests de génotoxicité, tant *in vitro* que *in vivo*, pour s'assurer que les changements génétiques dont on sait qu'ils entrent en jeu dans l'activation des oncogènes humains et animaux ne sont pas provoqués par l'agent en question. On pourrait également juger souhaitable d'isoler l'ADN du tissu pour s'assurer que l'agent n'a pas donné de dérivés d'ADN cancérogènes ou causé d'autres dommages à l'ADN. Il faut ensuite – et c'est plus exigeant – déterminer comment l'agent peut avoir induit le cancer par un mécanisme non génotoxique, puis monter les expériences nécessaires pour déterminer si ce mécanisme peut agir chez les humains, compte tenu des conditions d'exposition réelles ou perçues. Cette démarche, rarement facile, ne peut se faire que dans un cadre multidisciplinaire. Les scientifiques disposent à l'heure actuelle de deux cas identifiables où l'on pourrait présumer qu'un cancérogène non génotoxique ne présente aucun danger pour les humains. Ces deux cas seront abordés dans la section suivante.

Pour ce qui est des cancérogènes génotoxiques ou des cancérogènes non génotoxiques qui pourraient avoir des effets sur les humains, une série d'investigations scientifiques plus poussées sont nécessaires. Il faut d'abord établir les concentrations de l'agent et de ses métabolites dans les tissus de différentes espèces, puis déterminer le temps pendant lequel ces concentrations persistent. S'il est très peu probable que ces études revèlent des différences absolues dans les métabolites produits par les diverses espèces, elles pourraient toutefois faciliter l'évaluation finale en indiquant si l'agent testé est susceptible d'être plus ou moins efficace chez les humains que chez les espèces testées. Il

faut aussi établir si l'utilisation de nivaux de dose élevés perturbe le métabolisme de l'agent testé. La saturation de certaines voies métaboliques observée à fortes doses, comme la dose maximale tolérée utilisée dans le bio-essai de cancérogenèse peut, par exemple, perturber le métabolisme (Gehring et Blau, 1977). Il faudrait également tenir compte des autres facteurs qui peuvent différer entre les humains et les espèces de substitution, dont les taux hormonaux, la prolifération cellulaire et la nature spécifique des oncogènes qui entrent en jeu dans la genèse des tumeurs. Dans l'ensemble, ces considérations devraient permettre de déterminer certaines différences quantitatives plutôt que qualitatives dans la réponse des diverses espèces à un cancérogène.

6.3 Méthode du poids de la preuve

Dans l'esprit de l'approche du poids de la preuve, les autorités chargées de la réglementation doivent rassembler toutes les données sur l'agent étudié et tenter de fonder leurs conclusions sur l'ensemble de ces données plutôt que sur un élément en particulier. Par exemple, au Canada, tout additif alimentaire et tout pesticide doit faire l'objet d'un bio-essai de cancérogenèse chez les deux sexes de deux espèces différentes, selon un protocole semblable à celui dont il a été question au chapitre 4.

L'absence de toute cancérogénicité reliée au traitement dans deux bio-essais effectués de façon satisfaisante devrait normalement suffire à l'évaluateur pour conclure que le pouvoir cancérogène du produit testé n'est pas une source de préoccupation. Si, toutefois, des données provenant d'autres études soulèvent certaines inquiétudes – p. ex. (i) l'existence d'une série de tests de génotoxicité *in vitro* ou *in vivo* positifs, (ii) l'apparition d'une série de lésions pathologiques pouvant être considérées comme d'éventuels précurseurs tumoraux, (iii) l'observation d'une prolifération cellulaire intensive et soutenue (Clayson, 1987, 1989; Clayson et coll., 1989) donnant à penser que l'agent pourrait accélérer ou même induire des tumeurs par des mécanismes non génotoxiques, ou (iv) la forte présomption que l'agent, du fait de sa structure chimique, pourrait présenter un potentiel cancérogène (comme cela a été le cas de certains nitrofuranes utilisés en médecine vétérinaire) (Garner et coll., 1984) – l'évaluateur peut juger que l'ensemble des données manque de cohérence et que ces incohérences doivent être examinées. La tenue d'autres bio-essais de cancérogenèse, par exemple, peut ainsi être exigée. Ces bio-essais supplémentaires devraient de préférence faire appel à une espèce ou à une souche différente d'animal de laboratoire. Cette approche du poids de la preuve donne à l'évaluateur ou aux autorités chargées de la réglementation la souplesse dont ils ont besoin pour scruter des données apparemment incohérentes.

Cette approche peut également se révéler utile dans le cas des faux positifs – c'est-à-dire ces produits chimiques que l'on penserait ne pas être cancérogènes pour les humains mais qui, en fait, donnent des résultats positifs dans un ou plusieurs bio-essais sur des animaux. Au moins deux cas généraux dans lesquels ce genre de situation peut se présenter ont été recensés (Clayson, 1987). Le

premier est la présence de taux élevés de tumeurs dans certains tissus particuliers chez des animaux non traités. Le deuxième est l'intervention possible de la toxicité à fortes doses propre à un tissu dans l'accélération du processus de cancérogenèse. Il se pourrait que l'on découvre d'autres cas problèmes vu l'intensité des recherches effectuées actuellement pour comprendre la genèse de certaines tumeurs particulières chez les rongeurs, comme celles de la thyroïde, du rein et du pancréas chez les rats.

6.3.1 Tumeurs spontanées

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et la *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) reconnaissent que lorsque le rendement tumoral est important chez les animaux non traités, l'induction de tumeurs dans les tissus affectés perd de sa signification. À cet égard, la mise en garde du CIRC est plus générale que celle de l'EPA (tableau 6-1), qui se borne à des augmentations «marginales» dans le rendement tumoral. Dans ni l'un ni l'autre cas on n'analyse de façon suffisante le niveau auquel ces tumeurs d'origine naturelle commencent à poser un problème dans l'interprétation de la signification des résultats du bio-essai de cancérogenèse.

Tableau 6-1
Classification des cancérogènes de la *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) (1984)

Groupe A : Cancérogènes humains

Expression utilisée lorsqu'il y a des preuves épidémiologiques suffisantes de cancérogénicité pour les humains à l'appui d'une association causale entre l'exposition à l'agent (ou aux agents) et le cancer.

Groupe B : Cancérogènes humains probables

Englobe les agents pour lesquels les preuves épidémiologiques de cancérogénicité pour les humains varient de presque suffisantes à insuffisantes.

Le groupe B1 est réservé aux agents pour lesquels il existe des preuves épidémiologiques au moins limitées de cancérogénicité pour les humains. En l'absence de données suffisantes chez les humains, il est raisonnable, du point de vue pratique, de considérer les agents pour lesquels les preuves de cancérogénicité sont suffisantes chez les mammifères comme présentant un risque pour les humains.

Le groupe B2 est réservé aux agents pour lesquels les preuves de cancérogénécité sont insuffisantes chez les humains, mais suffisantes chez les animaux.

Groupe C : Cancérogènes humains possibles

Agents pour lesquels il existe des preuves de cancérogénicité limitées chez les animaux en l'absence de données pour les humains :

a. apparition non équivoque d'une tumeur maligne dans le cadre d'une seule expérience animale bien conduite;

b. apparition marginale d'une tumeur dans le cadre d'études de conception boiteuse ou dont les résultats ont été mal rapportés;

c. apparition de tumeurs bénignes mais non de tumeurs malignes, l'agent n'ayant donné aucune réponse à divers tests de mutagénicité à court terme;

d. réponse marginale dans un tissu réputé à risque élevé pour la formation de tumeurs.

Groupe D : Non classifiés

Agents pour lesquels les preuves de cancérogénicité sont insuffisantes.

Groupe E : Aucune preuve de cancérogénicité

Agents pour lesquels aucune preuve de cancérogénicité n'a été recueillie après au moins deux tests animaux bien exécutés sur des espèces différentes ou après des études animales et des études épidémiologiques.

Il est apparu qu'un oncogène transposable jouait un rôle dans la genèse de la tumeur hépatique de la souris B6C3F1 mâle, une des tumeurs spontanées les plus préoccupantes dans le bio-essai standard de cancérogenèse. Il semble donc raisonnable de supposer que cette tumeur se développe par suite d'un événement génétique (transposition de l'oncogène vers un site préféré dans le génome) suivi par la phase de développement tumoral. Pour évaluer l'importance de l'induction de cette tumeur dans le cadre d'un bio-essai de cancérogenèse, il faut chercher à établir si la tumeur est apparue par suite (i) d'une variation aléatoire dans le rendement tumoral, qui, chez les souris B6C3F1 mâles non traitées gardées selon les protocoles normalisés pendant deux ans, variait de 15 à 60 p. 100, (ii) de la promotion, par l'agent testé, du développement de la tumeur, par exemple, en augmentant le taux de prolifération cellulaire dans le tissu où les cellules sont, normalement, remplacées très lentement (iii) d'une action de l'agent testé sur les interactions hormonales modifiant l'incidence tumorale, ou (iv) du fonctionnement de l'agent testé comme cancérogène complet, assurant autant l'initiation que la promotion de la tumeur (c'est-à-dire que la substance chimique active les oncogènes nécessaires et favorise le développement tumoral).

Toutes ces possibilités font du rendement tumoral une information fort peu satisfaisante, les mêmes lésions apparaissant fréquemment chez les animaux non traités. C'est d'ailleurs pourquoi le CIRC considère que ces tumeurs ne constituent qu'une preuve limitée de cancérogénicité. Le CIRC note également que, dans certains cas, comme dans celui de la tumeur hépatique de la souris, il est difficile d'établir la différence entre les tumeurs bénignes et les tumeurs

malignes et qu'il est par conséquent difficile d'utiliser la malignité pour évaluer l'importance des tumeurs. L'évaluateur qui fait appel à l'approche du poids de la preuve a l'occasion de comparer les résultats aux tests de génotoxicité *in vivo* et les relations structure-activité de l'agent testé à ceux de cancérogènes connus. Lorsque ces comparaisons donnent à penser que l'agent testé est un cancérogène génotoxique, l'évaluateur peut exiger la tenue d'autres bio-essais de cancérogenèse ou recommander une action réglementaire immédiate. Dans certains cas, cette approche peut être fort pertinente sur le plan de la santé publique. Par exemple, 2-naphthylamine, un cancérogène professionnel bien connu qui provoque le cancer de la vessie chez les humains, n'a induit de tumeurs du foie que chez les souris dans un test classique sur des rats et des souris.

Comme seules les souris B6C3F1 mâles présentent une incidence naturelle élevée de tumeurs du foie, on considère en général qu'une importante augmentation de l'incidence de ces tumeurs chez les femelles est un indicateur valable de la cancérogénicité du produit testé. Encore une fois, le recours au poids de la preuve est conseillé. L'obligation d'utiliser la dose maximale tolérée (DMT) dans les bio-essais (voir section 4.2.4) risque en effet d'induire une certaine toxicité chez les animaux testés. L'évaluateur doit s'assurer qu'une éventuelle toxicité à la DMT n'entraîne pas une «défiminisation» de la souris femelle et ne la fasse pas réagir comme le mâle pour ce qui est du développement tumoral.

Les problèmes associés aux tumeurs du foie et des poumons chez les souris (notamment chez les souris de souche A, voir section 4.2.9.3) ont fait l'objet d'une foule d'analyses, même si leur utilité pour l'évaluation des cancérogènes est mise en doute. Moins nombreux sont les travaux qui visent à déterminer à partir de quel taux de tumeurs spontanées chez les animaux non traités il devient difficile pour l'évaluateur d'interpréter la signification des tumeurs induites dans d'autres tissus. Le problème est encore plus complexe qu'il ne semble à première vue, car il faut aussi porter attention aux tumeurs qui peuvent apparaître chez les animaux témoins peu de temps après la fin du bio-essai normal. Dans l'expérience «méga-souris» (Staffa et Mehlman, 1979), on a ainsi choisi la souris BALB/C femelle parce qu'après 24 mois, elle n'avait présenté qu'une faible incidence de tumeurs du foie. Il est cependant apparu par la suite que les souris gardées jusqu'à 33 mois avaient plus de 30 p. 100 de ces tumeurs, taux qui pourrait donner lieu aux problèmes dont il est question ici. Il serait intéressant, si l'on veut trouver une solution à ce problème, de savoir combien des 13 tissus considérés par Ashby et Tennant (1988) comme sujets à une tumorisation par les cancérogènes génotoxiques et non génotoxiques affichent en fait une incidence de tumeurs spontanées suffisamment élevée pour poser ce genre de problème.

6.3.2 Toxicité à fortes doses

Les raisons pour lesquelles la dose maximale tolérée (DMT) est utilisée et la façon dont cette dose est définie à l'heure actuelle ont été abordées à la section 4.2.4. Il n'est pas facile de déterminer d'avance avec précision la DMT; c'est pourquoi, certains bio-essais sont parfois effectués à des doses sensiblement supérieures. Lorsqu'on obtient ainsi la preuve de l'effet cancérogène d'une

substance avec une dose excessive, il est difficile pour l'évaluateur de ne pas en tenir compte, même si l'une des principales conditions nécessaires à la tenue d'un bon bio-essai n'est pas satisfaite et si la toxicité à forte dose peut contribuer à l'induction du cancer.

La meilleure façon d'illustrer les conséquences possibles de la toxicité à fortes doses dans un bio-essai de cancérogenèse est d'en donner un exemple. Ce genre de problème n'a guère été étudié jusqu'à présent et montre à quel point s'impose l'approche du poids de la preuve.

6.3.2.1 Hydroxyanisole butylé

L'hydroxyanisole butylé (BHA) est l'un des trois antioxydants phénoliques dont l'utilisation comme additif alimentaire est permise au Canada. Ces composés chimiques empêchent les aliments de se dégrader pendant le transport et le stockage. Ils sont donc fort importants pour l'industrie alimentaire centralisée d'aujourd'hui, car ils lui permettent d'offrir au public canadien des aliments de qualité à longueur d'année.

En 1982, Ito et ses collègues au Japon signalaient que le BHA à 2 p. 100 utilisé dans les aliments induisait des papillomes et des carcinomes du pré-estomac du rat; ils ont montré par la suite que les hamsters réagissaient de la même façon à de fortes teneurs de BHA, mais non les souris. Pourtant, cet agent était, selon toutes les données disponibles, un cancérogène non génotoxique dont la structure chimique ne ressemblait à celle d'aucun cancérogène reconnu. Les scientifiques de la Direction générale de la protection de la santé ont donc eu recours à deux techniques pour leurs investigations : l'examen pathologique direct et l'autoradiographie à la thymidine tritiée. Chez les rats nourris avec des aliments contenant du BHA à 2 p. 100 pendant 9 ou 27 jours, il est apparu que cet agent induisait une inflammation et une prolifération cellulaire, notamment dans la courbe inférieure du pré-estomac du rat, région où la plupart des tumeurs induites avaient été signalées. En outre, une étude dose-réponse du BHA effectuée après 9 jours par autoradiographie à [^{3}H]-thymidine a fixé la dose sans effet observé (NOEL) ou le seuil à une concentration de 0,25 p. 100 de BHA dans le régime alimentaire. La même NOEL a été observée dans une étude de 91 jours. Quelques autres phénols ont été donnés aux rats et ont accru la prolifération cellulaire dans leur pré-estomac (Nera et coll., 1984).

Le Canada a également participé à une étude internationale visant à déterminer si le BHA avait un effet quelconque sur les espèces dépourvues de pré-estomac. Les plus fortes doses tolérées de BHA ont ainsi été administrées dans le régime alimentaire à des porcs (Danemark), des chiens (États-Unis et Japon) et des primates non humains (Canada) pendant des périodes allant de 3 à 18 mois. Aucune de ces études à court terme n'a permis d'observer d'effets biologiques significatifs quelconques semblables à ceux qui ont été observés chez les rats et les hamsters. D'après ces résultats et ceux de quelques autres études, il semble donc très peu probable que les expositions alimentaires au BHA puissent avoir un effet sur les humains.

Le BHA n'est pas le seul composé cancérogène pour les rongeurs à avoir fait l'objet de recherches actives visant à déterminer son pouvoir d'induire également le cancer chez les humains. Une foule de chercheurs tentent en effet à l'heure actuelle de déterminer, par exemple, si les médicaments hypolipidémiants et d'autres «prolifférateurs de péroxisomes» de rongeurs, qui induisent des carcinomes hépatiques chez les rongeurs, pourraient avoir le même effet chez les humains. On étudie certaines substances capables d'induire des tumeurs aux reins chez les rats mâles en vue de savoir si le même effet non génotoxique pourrait se manifester chez les humains. On pense aujourd'hui que les produits chimiques qui perturbent la fonction thyroïdienne chez les rongeurs (c'est-à-dire les goitrogènes) ont un niveau seuil ou une NOEL (Paynter et coll., 1985). Tous ces travaux devraient nous permettre de mieux prédire les effets probables des cancérogènes de rongeurs chez les humains. Certains chercheurs (Clayson, 1989; Clayson et coll., 1989) se penchent depuis peu sur les tumeurs qui semblent être causées par des mécanismes semblables.

6.4 Conclusions

1. Lorsque des études épidémiologiques sérieuses ont prouvé de façon suffisante qu'un agent est cancérogène pour les humains, l'agent en question devrait sans hésitation être considéré comme capable d'induire le cancer chez les humains.

2. Lorsque les preuves épidémiologiques de cancérogénicité pour les humains sont limitées et qu'il existe par ailleurs des preuves suffisantes de cancérogénicité pour une espèce appropriée d'animal de laboratoire, l'agent devrait, encore une fois, sans hésitation, être considéré comme capable de causer le cancer chez les humains. S'il n'existe aucune preuve animale et uniquement des preuves limitées de cancérogénicité pour les humains sans preuve de cancérogénicité animale à l'appui, la prudence devrait faire en sorte que l'on prenne les mesures réglementaires appropriées.

3. En l'absence de toute preuve de cancérogénicité pour les humains, des preuves suffisantes de cancérogénicité chez deux espèces animales et des résultats positifs à des tests de génotoxicité *in vitro* ou *in vivo* devraient suffire à présumer que l'agent en question est cancérogène pour les humains.

4. Dans les conclusions 1 à 3, il n'est question que de l'efficacité potentielle de l'agent dans une population humaine spécifique et du degré de risque que court cette population.

5. Lorsque les preuves de cancérogénicité pour les animaux sont suffisantes et que l'agent donne une série de résultats négatifs à des tests de génotoxicité bien exécutés, d'autres expériences devraient être effectuées en vue de démontrer si l'agent en question peut être cancérogène pour les humains. Sans ces preuves supplémentaires, il peut être impossible de déterminer s'il y a matière à considérer l'agent comme peu susceptible d'avoir un effet sur les humains. Deux exemples ont été cités où il pourrait être possible d'arriver à une telle conclusion :
(i) lorsqu'il y a une forte incidence de tumeurs spontanées dans les tissus affectés

des animaux non traités utilisés pour le bio-essai, ou (ii) lorsqu'il y a des preuves substantielles que les tumeurs induites pourraient être la conséquence d'une toxicité à fortes doses chez l'animal testé.

6. Une preuve négative satisfaisante selon laquelle un agent n'est pas cancérogène pourrait être fondée sur l'obtention de résultats négatifs pour deux espèces dans des tests effectués conformément aux protocoles décrits dans le présent document, pourvu que toutes les données secondaires, y compris les données de génotoxicité, concordent avec cette conclusion.

7. Lorsque les preuves ne répondent pas aux normes établies dans les conclusions 1-5 ci-dessus, les autorités chargées de la réglementation doivent décider si d'autres données doivent être recueillies et, le cas échéant, quel genre de données.

7. Réglementation des cancérogènes

L'établissement de la cancérogénicité d'un composé chimique pour les animaux et l'évaluation selon la méthode du poids de la preuve des risques que présente le composé en question pour les humains ne constituent que les premières étapes de la gestion d'un cancérogène chimique. L'ampleur du risque présenté par le degré d'exposition perçu ou réel auquel sont soumis les humains (évaluation du risque) (Santé et Bien-être social Canada, 1989) doit également être évaluée comme telle, puis en fonction du cadre juridique, des facteurs économiques, de considérations sociologiques et de l'éventuelle réaction du public face au risque perçu, avant que l'on puisse prendre une décision quant à la réglementation nécessaire (gestion du risque).

Comme la société exige que l'on évalue d'abord le risque, puis qu'on le gère, les autorités chargées de la réglementation dans les divers secteurs de la santé ont dû faire appel à différentes approches pour réglementer les cancérogènes. C'est ainsi que certains additifs alimentaires artificiels directs et, de plus en plus souvent, certains pesticides reconnus cancérogènes peuvent voir leur utilisation interdite. Les contaminants alimentaires parfois produits par des moisissures naturelles (p. ex., aflatoxine B1, ochratoxine) demandent cependant une autre approche, car l'interdiction totale de tout produit contaminé compromettrait gravement nos approvisionnements alimentaires. Une bonne façon de les réglementer est d'imposer un plafond à leur concentration admissible dans les aliments contaminés destinés aux humains ou aux animaux. Enfin, d'autres contaminants peuvent, par exemple, passer dans les aliments à partir des matériaux d'emballage et nécessiter une réglementation visant à rendre ces matériaux plus sûrs.

La réglementation des produits pharmaceutiques pose une série de problèmes différents, étant donné que la personne qui court le risque, c'est-à-dire le patient, est également celle qui, en principe, tire profit de l'usage du produit. Dans le cas des médicaments en vente libre, qui sont auto-administrés et peuvent par conséquent faire l'objet d'abus, de même que des médicaments utilisés pour les maladies qui ne mettent pas la vie en danger et pour lesquels il existe habituellement d'autres modalités de traitement, les autorités chargées de la réglementation préfèrent parfois ne tolérer qu'un risque minimum. On se préoccupe moins par contre du pouvoir cancérogène de certains médicaments utilisés pour contrôler, améliorer ou guérir les maladies mortelles. Les patients atteints de ces maladies ont en effet peu de chance de survivre assez longtemps pour développer de nouveaux cancers s'ils ne sont pas traités. Toutefois, l'utilisation compassionnelle de médicaments cancérogènes ne doit être autorisée qu'après un examen mené en étroite collaboration avec les médecins, qui ne doivent avoir recours à ces substances que pour les fins auxquelles elles sont prévues.

L'interdiction de produits chimiques industriels peut se traduire par de lourdes pertes économiques pour l'industrie et pour la collectivité, de même que par la disparition de certains produits socialement désirables. De rigoureuses mesures de protection doivent être adoptées pour que les travailleurs courent le moins de risque possible dans leur milieu de travail.

Les produits chimiques dispersés dans l'environnement, en particulier ceux qui contaminent l'air et l'eau potable, soulèvent encore d'autres problèmes. En effet, ces substances, généralement présentes à de faibles teneurs dans l'environnement, peuvent quand même exposer des populations humaines entières. Comme leurs sources d'émissions sont souvent difficile à localiser et peuvent chevaucher les frontières nationales, leur contrôle s'avère extrêmement difficile. En outre, dans le cas de l'eau potable, la chloration, nécessaire pour protéger la population contre les bactéries infectieuses et aux autres organismes, augmente le niveau de contamination en introduisant dans le milieu de faibles concentrations d'une multitude de composés chlorés potentiellement cancérogènes. Un autre problème découle de ce que la pollution de l'air et de l'eau potable est généralement causée par un mélange extrêmement complexe d'une grande variété de substances différentes à faible concentration, alors que les bio-essais de cancérogénicité ne peuvent en général porter que sur un seul agent à la fois. Il est donc fort difficile d'établir des concentrations maximales admissibles (CMA) (Sous-comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1989) pour certains composés chimiques.

Il faut toutefois noter que les paramètres relevant du mode de vie, tels que le tabagisme et le régime alimentaire, reconnus comme les principales causes du cancer et des maladies coronariennes dans la plupart des pays développés, ne peuvent être contrôlés par la seule réglementation. L'éducation du public semble à ce chapitre la seule façon possible de réduire au minimum les risques que présentent ces importants facteurs cancérogènes humains.

8. *Quo vadis*? l'avenir des bio-essais de cancérogenèse animale

De toute évidence, le coût élevé du bio-essai de cancérogénèse, tant du point de vue du personnel compétent que de celui des ressources, empêche la tenue immédiate de ce genre d'essai pour la majorité des composés chimiques qui devraient idéalement y être soumis. Il faut maintenant de nouveau chercher à déterminer quelles substances ont le plus besoin d'être testées, lesquelles ressemblent assez à d'autres cancérogènes pour que leur étude puisse être considérée comme inutile, et lesquelles semblent ne pas être cancérogènes.

À l'heure actuelle, il semble bien que les tests de génotoxicité *in vivo* ou *in vitro* bien validés (Santé et Bien-être social Canada, 1989) et l'étude des relations structure-activité à l'aide des systèmes d'intelligence artificielle informatisée (Rosenkranz et Klopman, 1990) devraient permettre de prévoir l'activité cancérogène de nombreux agents. Ce genre d'études scientifiques pourrait dans une certaine mesure réduire notre dépendance actuelle vis-à-vis des bio-essais. Toutefois, de nombreux autres composés chimiques devront être testés avant que cet important bio-essai sur les rongeurs ne devienne redondant.

L'amélioration de nos connaissances sur la cancérogenèse – sur le pourquoi et le comment du cancer – devrait grandement faciliter la reconnaissance des cancérogènes à l'aide de méthodes semblables à celles que l'on prône déjà pour l'évaluation du risque de cancérogènes connus et qui font appel à l'approche du poids de la preuve pour l'extrapolation aux humains des résultats des bio-essais sur les rongeurs. Il faudra toutefois faire encore d'importants progrès en ce qui concerne les aspects du processus de la cancérogenèse qui relèvent de la biologie et, en particulier, de la biologie moléculaire, avant de pouvoir reconnaître avec exactitude les agents actifs chez les humains.

La majorité des bio-essais de cancérogenèse effectués jusqu'à présent étaient conçus pour des composés chimiques et artificiels, comme les pesticides, les additifs alimentaires ou les substances migrant dans les aliments, celles qui sont produites par suite de la contamination par les moisissures ou de la cuisson des aliments, les additifs alimentaires ou les substances utilisées comme médicaments pour les maladies non terminales, les contaminants de l'environnement et ceux qui atteignent une teneur biologiquement significative en milieu de travail. Comme ces substances chimiques peuvent faire l'objet de mesures réglementaires, les bio-essais peuvent être considérés comme de précieux instruments pour protéger la santé publique.

Quant aux substances d'origine naturelle contenues dans les aliments, on considérait inutile de les soumettre à des essais étant donné qu'on ne pouvait prendre à leur sujet aucune mesure réglementaire à moins d'interdire la consommation de certaines cultures entières. Cet état de choses a cependant radicalement changé depuis l'apparition des techniques de génie biogénétique qui

permettent au sélectionneur de modifier radicalement le génome de certaines plantes vivrières. Si, comme cela semble probable compte tenu du fait que 35 p. 100 des cancers humains sont associés au régime alimentaire ou à la nutrition aux États-Unis (Doll et Peto, 1981), les cultures vivrières contiennent effectivement des cancérogènes naturels, les manipulations biogénétiques pourraient être bénéfiques dans la mesure où elles permettraient d'abaisser les concentrations de ces agents nocifs dans les cultures; par contre, elles pourraient être désastreuses si elles avaient pour effet de les augmenter de façon significative.

De toute façon, du point de vue de la santé publique, ces constituants naturels potentiellement cancérogènes des aliments, comme les phytolectines, doivent être identifiés et leurs concentrations surveillées dans les cultures originales et les cultures modifiées (comme les concentrations excessives de solanine dans les pommes de terre nouvelles et de 8-hydroxypsoralen dans le céleri modifié). Les cancérogènes d'origine naturelle contenus dans les aliments doivent être identifiés, ne serait-ce que parce qu'il sera extrêmement difficile de les reconnaître comme causes de l'accroissement des cancers humains par des moyens épidémiologiques à l'avenir. Il ne faudrait pas présumer, cependant, que tous les cancérogènes présents dans les cultures présenteront nécessairement les mêmes paramètres moléculaires que les cancérogènes de synthèse.

9. Bibliographie

Abraham, S., Lowenstein, F.W. et O'Connell, D.E. (1976). *Preliminary findings of the First Health and Nutrition Examination Survey, United States 1971-1972. Dietary intake and biochemical findings*. DHEW Publication No. (HRA) 76-1219-1. National Center for Health Statistics, Rockville, Md. Health Resources Administration, Washington, D.C.

ACGIH (19ACGIH (1987). *Threshold limit values and biological exposure indices for 1987-1988*. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio.

Agriculture Canada (1987). Programme de centralisation du contrôle des résidus dans les aliments, Division des pesticides.

Aitio, A. (1984). «Sources of error and quality control in biological monitoring». *Biological monitoring and surveillance of workers exposed to chemicals*. Sous la direction de A. Aitio, V. Riihimaki, and H. Vainio. Hemisphere Publ. Corp., Washington, D.C. pp. 263-272.

Aitio, A. et Jarvisalo, J. (1985). «Biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals: collection, processing and storage of specimens». *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15(2):121-139.

Andersen, M.E., Clewell III, H.J., Gargas, M.L., Smith, F.A. et Reitz, R.H. (1987). «Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment for methylene chloride». *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87:185-205.

Armitage, P. (1985). «Multistage models of carcinogenesis». *Environ. Health Perspect.* 63:195-201.

Armitage, P. et Doll, R. (1961). «Stochastic models for carcinogenesis». *Fourth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*. University of California Press, Berkeley, Calif. pp. 19-38.

Arnold, D.L., Grice, H.C. et Krewski, D.R. (1990). *Handbook of* in vivo *toxicity testing*. Academic Press, San Diego, Calif.

Ashby, J. et Tennant, R.W. (1988). «Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the United States NCI/NTP». *Mutat. Res.* 204:17-115.

Barbacid, M. (1986). «Oncogenes and human cancer: cause or consequence»? *Carcinogenesis* 7:1037-1042.

Barr, J.T. (1985). «The calculation and use of carcinogenic potency: a review». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 5:432-459.

Bazzarre, T.L. et Myers, M.P. (1978). «The collection of food intake data in cancer epidemiology studies». *Nutr. Cancer* 1(4):22-45.

Bennett, B.G. (1986). «Exposure assessment for metals involved in carcinogenesis». *IARC Sci. Publ.* 71:115-127.

Berenblum, I. et Shubik, P. (1947a). «The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin». *Br. J. Cancer* 1:379-382.

Berenblum, I. et Shubik, P. (1947b). «A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin». *Br. J. Cancer* 1:383-391.

Berenblum, I. et Shubik, P. (1949). «The persistence of latent tumour cells induced in the mouse's skin by a single application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene». *Br. J. Cancer* 3:384-386.

Bernard, A. et Lauwerys, R. (1986). «Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals». *J. Occup. Med.* 28(8):558-562.

Bernard, A. et Lauwerys, R. (1987). General principles for biological monitoring of exposure to chemicals. In: *Biological monitoring of exposure to chemicals and organic compounds*. Sous la direction de M.H. Ho and H.K. Dillon. John Wiley & Sons, New York, N.Y. pp. 1-16.

Bernstein, L., Gold, L.S., Ames, B.N., Pike, M.C. et Hoel, D.G. (1985). «Some tautologous aspects of the comparison of carcinogenic potency in rats and mice». *Fundam. Appl. Toxicol.* 5:79-86.

Bretthauer, E.W. (1989). «Exposure assessment research at EPA». Keynote address at 1989 Environmental Protection Agency and Air and Waste Management Association Symposium on Total Exposure Assessment Methodology – A New Horizon, November 27-30, Las Vegas, Nev.

Bristol, D.W., MacLeod, K.E. et Lewis, R.G. (1984). «Direct and indirect chemical methods for exposure assessment». *Stud. Environ. Sci.* 24:79-119.

Brown, C.C. and Koziol, J.A. (1983). «Statistical aspects of the estimation of human risk from suspected environmental carcinogens». *SIAM Rev.* 25:151-181.

Brown, K.G. et Hoel, D.G. (1983). «Modelling time-to-tumor data: Analysis of the ED_{01} study». *Fundam. Appl. Toxicol.* 3:458-469.

Callahan, M.A. (1987). «Science and exposure assessment». *Environ. Sci. Technol.* 21:1139.

Center for Disease Control (1972). «Ten State Nutrition Survey 1968-1970». *DHEW Publ.* No. (HSM) 72-8130, 72-8132, 72-8133. Health Services and Mental Health Administration, Washington, D.C.

CIRC (1972-1987). *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*. Vols. 1-42. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

CIRC (1984). *Models, mechanisms and etiology of tumor promotion*. IARC Monogr. No. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

CIRC (1987). *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans*. Suppl. 7. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Clayson, D.B. (1962). *Chemical carcinogenesis*. Little-Brown, Boston, Mass.

Clayson, D.B. (1976). «Occupational bladder cancer». *Prev. Med.* 5:228-244.

Clayson, D.B. (1982). «Carcinogenesis in the developing organism: Could protocols for testing be improved»? *Int. J. Biol. Res. Pregnancy* 2:150-158.

Clayson, D.B. (1987). «The need for biological risk assessment in reaching decisions about carcinogens». *Mutat. Res.* 184:243-269.

Clayson, D.B. (1989). «Can a mechanistic rationale be provided for non-genotoxic carcinogens identified in rodent bioassays»? *Mutat. Res.* 221:53-67.

Clayson, D.B. et Krewski, D.R. (1990). «Objectives of toxicity testing». *Handbook of in vivo toxicity testing*. Sous la direction de D.L. Arnold, H.C. Grice, and D.R. Krewski. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 3-18.

Clayson, D.B., Iverson, F., Nera, E., Lok, E., Rogers, C., Rodrigues, C., Page, D. et Karpinski, K. (1986). «Histopathological and radioautographical studies on the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole and related chemicals». *Food Chem. Toxicol.* 24:1171-1182.

Clayson, D.B., Nera, E.A. et Lok, E. (1989). «The potential for the use of cell proliferation studies in carcinogen risk assessment». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 9:284-295.

Cohen, B.S., Harley, N.H. et Lippmann, M. (1984). «Bias in air sampling techniques used to measure inhalation exposure». *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45:187-192.

Comité consultatif canadien sur la mutagénécité des contaminants de l'environnement (1986). *Lignes directrices sur l'utilisation des tests de mutagénicité pour l'évaluation toxicologique des produits chimiques*. Santé et Bien-être social Canada, Environnement Canada. Ottawa (Ont.).

Conacher, H.B.S., Graham, G.F., Graham, R.A., Newsome, W.H. et Verdier, P. (1989). «The Health Protection Branch Total Diet Program: An overview». *J. Inst. Can. Technol. Aliment.* 22:322-326.

Coomes, T.J., Sherlock, J.C. et Walters, B. (1982). «Studies in dietary intake and extreme food consumption». *R. Soc. Health J.* 102:119-123.

Coye, M.J., Lowe, J.A. et Maddy, K.J. (1986). «Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: II. Monitoring of intact pesticides and their metabolites». *J. Occup. Med.* 28(8):628-636.

Crouch, E., Wilson, R. et Zeise, L. (1987). «Tautology or not tautology»? *J. Toxicol. Environ. Health* 20:1-10.

Crump, K.S. (1984). «An improved procedure for low-dose carcinogenic risk assessment from animal data». *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 5:339-348.

Dabeka, R.W. et Mckenzie, D. (1987). «Lead, cadmium, and fluoride levels in market milk and infant formulas in Canada». *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70:754-757.

Davis, D.L. et Gusman, S. (1982). «Exposure assessment: New frontier, old problems». *Toxic Subst. J.* 4:2-3.

Dolan, M.E., Oplinger, M. et Pegg, A.E. (1988). «Sequence specificity of guanine alkylation and repair». *Carcinogenesis* 9:2139-2143.

Doll, R. et Peto, R. (1981). «The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today». *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1191-1308.

Douglas, G.R., Blakey, D.H. et Clayson, D.B. (1988). «Genotoxicity tests as predictors of carcinogens: An analysis». *Mutat. Res.* 196:83-93.

Dourson, M.L. et Stara, J.F. (1983). «Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factors. Regul». *Toxicol. Pharmacol.* 3:224-238.

Droz, P.O. et Guillemin, M.P. (1986). «Occupational exposure monitoring using breath analysis». *J. Occup. Med.* 28:593-602.

Durham, W.T. (1981). «Introduction. In: *Dermal exposure related to pesticide use, discussion of risk assessment*». Sous la direction de R.C. Honeycutt, G. Zweig, et N.N. Ragsdale. *Am. Chem. Soc. Symp Ser.* 273:xiii-xiv.

Elder, R.L. (ed.) (1988). «Final report on the safety assessment of methylene chloride. 15th report of the Cosmetic Ingredients Review (Expert Panel)». *J. Am. Coll. Toxicol.* 7(6):741-835.

Enslien, K. (1987). Computer-assisted prediction of toxicity. In: *Toxic substances and human risk: Principles of data interpretation*. Sous la direction de R.G. Tardiff et J.V. Rodricks. Plenum Press, New York, N.Y. pp. 317-336.

Evans, W.K. (1989). «Supportive care for patients with small cell lung cancer». *Lung Cancer* 5:319-324.

Foulds, L. (1969). Neoplastic development. Vol. 1. Academic Press, London, U.K.

Frank, R., Braun, H.E. et Ripley, B.D. (1987a). «Residues of insecticides, fungicides and herbicides on Ontario grown vegetables, 1980-1985». *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70:1081-1086.

Frank, F., Braun, H.E. et Ripley, B.D. (1987b). «Residues of insecticides, fungicides and herbicides in fruit produced in Ontario, Canada, 1980-1984». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39:272-279.

Franklin, C.A. (1989). «Percutaneous absorption of pesticides. In: Biological monitoring for pesticide exposure: Measurement, estimation, and risk reduction». Sous la direction de R.G.M. Wang, C.A. Franklin, R.C. Honeycutt, et J.C. Reinert. *Am. Chem. Symp. Ser.* No. 382. pp. 126-130.

Franklin, C.A., Muir, N.I. et Greenhalgh, R. (1981). «The assessment of potential health hazards to orchardists spraying pesticides». *Pesticide residues and exposure*. Sous la direction de J.R. Plimmer. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* No. 182. pp. 157-168.

Franklin, C.A., Somers, D.A. et Chu, I. (1989). «Use of percutaneous absorption data in risk assessment». *J. Am. Coll. Toxicol.* 8:815-827.

Freireich, E.J., Gehan, E.A., Rall, D.P., Schmidt, L.H. et Skipper, H.E. (1966). «Quantitative comparison of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man». *Cancer Chem. Rep.* 50:219-248.

Garner, R.C., Martin, C.N. et Clayson, D.B. (1984). «Carcinogenic aromatic amines and related compounds». In: *Chemical carcinogens*. Vol. 1. 2e édition. Sous la direction de C.E. Searle. *Am. Chem. Soc. Monogr.* No. 182. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 175-276.

Gart, J.J., Krewski, D., Lee, P.N., Tarone, R.E. et Wahrendorf, J. (1986). «Statistical methods in cancer research». III. The design and analysis of long-term animal experiments. *IARC Sci. Publ.* 79.

Gartrell, M.J., Craun, J.C., Podrebarac, D.S. et Gunderson, E.L. (1986a). «Pesticides, selected elements and other chemicals in adult total diet samples, October 1980 – March 1982». *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69:146-161.

Gartrell, M.J., Craun, J.C., Podrebarac, D.S. et Gunderson, E.L. (1986b). «Pesticides, selected elements and other chemicals in infant and toddler total diet samples, October 1980 – March 1982». *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69:123-145.

Gaylor, D.W., Greenman, D.L. et Frith, C.H. (1985). «Urinary bladder neoplasms induced in Bald/C female mice with low doses of 2-acetylaminofluorene». *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 6:127-136.

Gehring, P.J. et Blau, G.E. (1977). «Mechanism of carcinogenesis: Dose response». *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1:163-179.

Godfrey, K. (1983). *Compartmental models and their application*. Academic Press, London, U.K.

Gold, L.S., Sawyer, C.B., Magaw, R., Backman, G.M., de Veciana, M., Levinson, R., Hooper, N.K., Havender, W.R., Bernstein, L., Peto, R., Pike, M.C. et Ames, B.N. (1984). «A carcinogenic potency database of the standardized results of animal bioassays». *Environ. Health Perspect.* 58:9-319.

Gold, L.S., Ward, J.M., Bernstein, L. et Stern, B. (1986). «Association between carcinogenic potency and tumor pathology in rodent carcinogenesis bioassays». *Fundam. Appl. Toxicol.* 6:677-690.

Greenfield, R.E., Ellwein, L.B. et Cohen, S.M. (1984). «A general probabilistic model of carcinogenesis: Analysis of experimental urinary bladder cancer». *Carcinogenesis* 5:437-445.

Groupe de travail fédéral-provincial sur l'eau potable (1989). *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada*. 4e éd., Comité consultatif fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail. Ministère de la Santé nationale et du Bien-être social.

Gunderson, E.L. (1988). «FDA Total Diet Survey, April 1982 – April 1984. Dietary intakes of pesticides, selected elements and other chemicals». *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:1200-1209.

Gunner, S.W. et Kirkpatrick, D.C. (1979). «Approaches for estimating human intakes of chemical substances». *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 12:27-31.

Hammond, E.C., Selikoff, I.J., Lawther, P.L. et Seidman, H. (1976). «Inhalation of benzopyrene and cancer in man». *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 271:116-124.

Hardisty, J.F. et Eostis, S.L. (1990). «Toxicological pathology; a critical stage in study interpretation». *Progress in predictive toxicology*. Sous la direction de D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, et J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 41-62.

Haseman, J.K. et Huff, J.E. (1987). «Species correlations in long term carcinogenicity studies». *Cancer Lett.* 37:125-132.

Henschler, D. (1984). «Exposure limits: History, philosophy, future developments». *Ann. Occup. Hyg.* 28(1):79-92.

Herbst, A.L., Ulfelder, H. et Poskanzer, D.C. (1971). «Adenocarcinoma of the vagina: Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women». *N. Engl. J. Med.* 284:878-881.

Hoel, D.G., Kaplan, N.L. et Anderson, M.W. (1983). «Implication of nonlinear kinetics on risk estimation in carcinogenesis». *Science* 219:1032-1037.

Homan, E.R. (1972). «Quantitative relationships between toxic doses of anti-tumor chemotherapeutic agents in animals and man». *Cancer Chem. Rep.* 3:13-19.

Hushon, J.M. et Clerman, R.J. (1981). «Estimation of exposure to hazardous chemicals». *Hazard assessment of chemicals. Current developments.* Vol. 1. Sous la direction de J. Saxena et F. Fisher. Academic Press, New York, N.Y. pp. 324-388.

Ito, N., Hagiwara, A., Shibata, M., Ogiso, T. et Fukushima, S. (1982). «Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole». *Gann* 73:332-334.

Juchau, M. et Harris, C. (1990). «Age : The developing organism as a toxicological target». *Progress in predictive toxicology.* Sous la direction de D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, et J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 91-111.

Kinzel, V., Fürstenberger, G., Loehrke, H. et Marks, F. (1986). «Three stage tumorigenesis in mouse skin: DNA synthesis as a prerequisite for the conversion stage induced by TPA prior to initiation». *Carcinogenesis* 7:779-782.

Klein, G. (1987). «The approaching era of the tumor suppressor genes». *Science* 238:1539-1545.

Klein, G. et Klein, E. (1984). «Commentary: Oncogene activation and tumour progression». *Carcinogenesis* 5:429-435.

Konstantinov, V.G. et Kuz'minykh, A.T. (1971). «Resinous substances and 3,4-benzpyrene in the air of electrolysis shops of aluminum plants and their role in carcinogenesis». *Gig. Sanit.* 36:39-42.

Krewski, D. et Franklin, C.A. (1991). *Statistics in toxicology.* Gordon & Breach Science Publishers, New York, N.Y.

Krewski, D. et Murdoch, D. (1988). «Quantitative factors in carcinogenic risk assessment». *Carcinogen risk assessment: New directions in the qualitative and quantitative aspects.* Banbury Report 31, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Krewski, D. et Van Ryzin, J. (1981). «Dose response models for quantal response toxicity data». *Statistics and related topics.* Sous la direction de M. Csorgo, D. Dawson, J.N.K. Rao, et E. Saleh. North-Holland, Amsterdam. pp. 201-231.

Krewski, D., Murdoch, D.J. et Withey, J.R. (1987). «The application of pharmacokinetic data in carcinogenic risk assessment». *Drinking water and health.* Vol. 8. Pharmacokinetics and risk assessment. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 441-468.

Krewski, D., Murdoch, D. et Withey, J.R. (1989). «Recent developments in carcinogenic risk assessment (with discussion)». *Health Phys.*, Suppl. 1:313-326.

Krewski, D., Szyszkowicz, M. et Rosenkranz, H. (1990a). «Quatitative factors in chemical carcinogenesis: Variation in carcinogenic potency». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 12:13-29.

Krewski, D., Goddard, M.J. et Withey, J.R. (1990b). «Carcinogenic potency and interspecies extrapolation». *Mutation and the environment, Part D: Carcinogenesis.* Sous la direction de M.L. Mendelsohn and R.J. Alberdini. Wiley-Liss, New York, N.Y. pp. 323-334.

Krewski, D., Gaylor, D.W. et Szyszkowicz, M. (1991). «A model-free approach to low dose extrapolation». *Environ. Health Perspect.* 90:279-285.

Kutz, F.W. (1983). «Chemical exposure monitoring». *Residue Rev.* 85:277-292.

Linstedt, S.L. (1987). «Allometry: Body size constraints in animal design». *Drinking water and health*. Vol. 8. Pharmacokinetics in risk assessment. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 65-79.

Lippmann, M. (1987). «Human exposures and dose to target tissues». *Toxic chemicals, health and the environment*. Sous la direction de L.B. Lave et A.C. Upton. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.

Livingstone, S.K. (1953). «Carcinogens in alumina reduction». *Med. World* 78:31-33.

Lok, E., Nera, E.A., Iverson, F., Scott, F., So, Y., et Clayson, D.B. (1988). «Dietary restriction, cell proliferation and carcinogenesis: A preliminary study». *Cancer Lett.* 38:249-255.

Lutz, W.K. (1990). «Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis». *Carcinogenesis* 11:1243-1247.

Maibach, H.I., Feldmann, R.J., Milby, T.H. et Serat, W.F. (1971). «Regional variation in percutaneous penetration in man – Pesticides». *Arch. Environ. Health* 23:208-211.

Marr, J.W. (1971). «Individual dietary surveys: Purposes and methods». *World Rev. Nutr. Diet.* 13:105-164.

Menzel, D.B. (1987). «Physiological pharmacokinetic modeling». *Environ. Sci. Technol.* 21:944-950.

Metzger, B., Crouch, E. et Wilson, R. (1989). «On the relationship between carcinogenicity and acute toxicity». *Risk Anal.* 9:169-177.

Moolgavkar, S.H. (1986a). «Carcinogenesis modeling: From molecular biology to epidemiology». *Annu. Rev. Public Health* 7:151-169.

Moolgavkar, S.H. (1986b). «Hormones and multistage carcinogenesis». *Cancer Surv.* 5:635-648.

Moolgavkar, S.H. et Luebeck, G. (1990). «Two-event model for carcinogenesis: biological, mathematical, and statistical considerations». *Risk. Anal.* 10:323-341.

Moolgavkar, S.H., Dewanji, A. et Venzon, D.J. (1988). «A stochastic two-stage model for cancer risk assessment. 1: The hazard function and the probability of tumor». *Risk Anal.* 8:383-392.

Morrisson, H.I., Semenciw, R.M., Mao, Y. et Wigle, D.T. (1988). «Cancer mortality among a group of fluorspar miners exposed to radon progency». *Am. J. Epidemiol.* 128:1266-1275.

Murdoch, D.J. et Krewski, D. (1988). «Carcinogenic risk assessment with time-dependent exposure patterns». *Risk Anal.* 8:521-530.

National Toxicology Program (1984). *Report of the Ad Hoc Panel on Chemical Carcinogenesis Testing and Evaluation*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Washington, D.C.

Nera, E.A., Lok, E., Iverson, F., Ormsby, E., Karpinski, K.F. et Clayson, D.B. (1984). «Short-term pathological and proliferative effects of butylated hydroxyanisole and other phenolic antioxides on the forestomach of Fischer 344 rats». *Toxicology* 32:197-213.

Neumann, H.-G. (1984). «Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents». *Arch. Toxicol.* 56:1-6.

Nutrition Canada (1976). *Rapport sur les habitudes alimentaires : un rapport de Nutrition Canada*. Santé et Bien-être social Canada.

OCDE (1982). *Les bonnes pratiques de laboratoire dans les essais des produits chimiques : rapport final du Groupe d'experts sur les bonnes pratiques de laboratoire*. Organisation de coopération et de développement économiques. Paris.

OCDE (1984). *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Organisation de coopération et de développement économiques. Paris.

Office of Science and Technology Policy (1985). «Chemical carcinogens: A review of the science and its associated principles». *Fed. Regist.* 50:10372-10442.

O'Flaherty, E.J. (1981). *Toxicants and drugs: Kinetics and dynamics.* John Wiley & Sons, New York, N.Y.

OMS (1984). *Exposition aux substances irritantes pour les voies respiratoires : limites recommandées d'exposition professionnelle à visée sanitaire.* Série de Rapports techniques nº 707. Organisation mondiale de la Santé. Genève. 154 p.

OMS (1985). *Recommandations pour l'étude des quantités de contaminants chimiques apportées par l'alimentation.* OMS, Publication offset nº 87. Organisation mondiale de la Santé. Genève.

OMS (1989). *Guide pour le calcul prévisionnel des quantités de résidus de pesticides apportées par l'alimentation.* Programme commun PNUE/FAO/OMS de surveillance de la contamination des produits alimentaires en collaboration avec le Comité du Codex sur les résidus de pesticides. Organisation mondiale de la Santé. Genève.

Pao, E.M., Fleming, K.H., Guenther, P.M. et Mickle, S.J. (1982). *Foods commonly eaten by individuals: Amount per day and per eating occasion.* Human Nutrition Information Service, U.S. Department of Agriculture.

Paynter, O.E., Burin, G.J., Jaeger, R.B. et Gregorio, C.A. (1985). «Goitrogens and thyroid follicular cell neoplasia: Evidence for a threshold process». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 8:102-119.

Pekkarinen, M. (1970). «Methodology in the collection of food consumption data». *World Rev. Nutr. Cancer* 12:145-171.

Pellizzari, E., Zweidinger, R.A. et Sheldon, L.S. (1988). «Determination of benzene, toluene and xylene in breath samples by gas chromatography/mass spectrometry». *IARC Sci.* Publ. 85:267-279.

Peto, R., Pike, M.C., Bernstein, L., Gold, L.S. et Ames, B.N. (1984). «The TD_{50}: A proposed general convention for the numerical description of the carcinogenic potency of chemicals in chronic-exposure animal experiments». *Environ. Health Perspect.* 58:1-8.

Pinkel, D. (1958). «The use of body surface area as a criterion of drug dosage of cancer chemotherapy». *Cancer Res.* 18:853-856.

Pitot, H.C. et Sirica, A.E. (1980). «The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis». *Biochem. Biophys. Acta* 605:191-215.

Portier, C.J. (1987). «Statistical properties of a two-stage model of carcinogenesis». *Environ. Health Perspect.* 76:125-131.

Portier, N. et Kaplan, N. (1989). «The variability of safe dose estimates when using complicated models of the carcinogenic process. A case study: Methylene chloride». *Fundam. Appl. Toxicol.* 13:533-544.

Ramel, C. (1986). «Deployment of short term assays for the detection of carcinogens; genetic and molecular considerations». *Mutat. Res.* 168:327-342.

Reinert, J.C., Nielsen, A.P., Lunchick, C., Hernandez, O. et Mazzetta, D.M. (1986). «The United States Environmental Protection Agency's guidelines for applicator exposure monitoring». *Toxicol. Lett.* 33:183-191.

Reitz, R.H. (1990). «Distribution, persistence, and elimination of toxic agents (pharmacokinetics)». *Progress in predictive toxicology.* Sous la direction de D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, et J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 79-90.

Rieth, J.P. et Starr, T.B. (1989). «Chronic bioassays: Relevance to quantitative risk assessment of carcinogens». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 10:160-173.

Ritter, L. et Franklin, C.A. (1989). «Use of biological monitoring in the regulatory process. In: Biological monitoring for pesticide exposure: Measurement, estimation, and risk reduction». Sous la direction de R.G.M. Wang, C.A. Franklin, R.C. Honeycutt, et J.C. Reinert. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* No. 382. pp. 354-367.

Rosenkranz, H.S. et Klopman, G. (1990). «Structural basis of carcinogenicity in rodents of genotoxicants and non-genotoxicants». *Mutat. Res.* 228:105-124.

Rous, P. et Kidd, J.G. (1941). «Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: A study of the tar tumors of rabbits». *J. Exp. Med.* 73:365-390.

Santé et Bien-être social Canada (1989). *Actualité : contaminants chimiques des aliments – évaluation des risques pour la santé.* Direction générale de la protection de la santé. Ottawa (Ont.)

Santé et Bien-être social Canada (1990). *Directives de la Direction des médicaments.* Ottawa (Ont.)

Sawyer, C., Peto, R., Bernstein, L. et Pike, M.C. (1984). «Calculation of carcinogenic potency from long-term animal carcinogenesis experiments». *Biometrics* 40:27-40.

Selikoff, I.J. et Lee, D.H.K. (1978). *Asbestos and disease.* Academic Press, New York, N.Y.

Severn, D.J. (1987). «Exposure assessment: Fourth of a five part series on cancer risk assessment». *Environ. Sci. Technol.* 21(12):1159-1163.

Shimkin, M.B. et Stoner, G.D. (1975). «Lung tumors in mice: Application to carcinogenesis bioassay». *Adv. Cancer Res.* 21:1-58.

Société canadienne du cancer (1990). *Statistiques canadiennes sur le cancer*, Toronto (Ont.).

Staffa, J.A. et Mehlman, M.A. (1979). «Innovations in cancer risk assessment (ED01 Study)». *Proceedings of a symposium sponsored by the National Center for Toxicological Research*, U.S. Food and Drug Administration, and the American College of Toxicology. Pathotox Publishers, Park Forest South, Ill. pp. 246

Statistics Canada (1981). *Cancer au Canada.* N° de catalogue 82-207 (annuel). Ottawa (Ont.).

Statistics Canada (1986). *Consommation apparente des aliments par personne au Canada.* N^{os} de catalogue 32-229 et 32-230; Parts I and II.

Swenberg, J.A., Fedtke, N., Fennell, T.R. et Walker, V.E. (1990). «Relationships between carcinogen exposure, DNA adducts and carcinogenesis». *Progress in predictive toxicology.* Sous la direction de D.B. Clayson, I.C. Munro, P. Shubik, et J.A. Swenberg. Elsevier, Amsterdam. pp. 161-184.

Tarone, R.E., Chu, K.C. et Ward, J.M. (1981). «Variability in the rates of some naturally-occurring tumors in Fischer 344 rats and (C57BL/6N × C3H/HeN) F1 (B6C3F1) mice». *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1175-1181.

Thériault, G., De Guire, L. et Cordier, S. (1981). «Reducing aluminum: An occupation possibly associated with bladder cancer». *Can. Med. Assoc. J.* 124:419-425.

Thorslund, T. et Charnley, G. (1988). «Quantitative dose-response models for tumor promoting agents». *Carcinogen risk assessment: New directions in qualitative and quantitative aspects.* Banbury Report No. 31, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 245-256.

Thorslund, T.W., Brown, C.C. et Charnley, G. (1987). «Biologically motivated cancer risk models». *Risk Anal.* 7:109-119.

Travis, C.T. et White, R.K. (1988). «Interspecies scaling of toxicity data». *Risk Anal.* 8:119-125.

U.S. Congress Office of Technology Assessment (1987). *Identifying and regulating carcinogens.* Président : M.K. Udall. OTA-BP-H-42. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

U.S. Environmental Protection Agency (1983a). «Toxic substances control; good laboratory practice standards». *Fed. Regist.* 48:53922-53944.

U.S. Environmental Protection Agency (1983b). «Pesticide programs; good laboratory practice standards». *Fed. Regist.* 48:53946-53969.

U.S. Environmental Protection Agency (1984). «Guidelines for carcinogen risk assessment». *Fed. Regist.* 51:34014-34025.

U.S. Environmental Protection Agency (1986). «Guidelines for estimating exposures». *Fed. Regist.* 51:34042-34054.

U.S. Environmental Protection Agency (1987a). *Report of the EPA Workshop on the Development of Risk Assessment Methodologies for Tumor Promotors*. U.S. EPA Report EPA/600/9-87/03, Washington, D.C.

U.S. Environmental Protection Agency (1987b). *Pesticide assessment guidelines, Subdivision U. Applicator exposure monitoring*. U.S. EPA Report PB87-133286.

U.S. Food and Drug Administration (1976). «Nonclinical laboratory studies, proposed regulations for good laboratory practice». Fed. Regist. 41:51206-51230.

U.S. Food and Drug Administration (1989). «Cosmetics; ban on the use of methylene chloride as an ingredient of cosmetic products». *Fed. Regist.* 54(124):27328-27342.

U.S. Interagency Staff Group on Carcinogens (1986). «Chemical carcinogens: A review of the science and its associated principles». *Environ. Health Perspect.* 67:201-282.

Vainio, H. (1985). «Current trends in the biological monitoring of exposure to carcinogens». *Scand. J. Work Environ. Health* 11:1-6.

Vainio, H., Hemminki, K. et Wilbourn, J. (1985). «Data on the carcinogenicity of chemicals in the IARC Monographs programme». *Carcinogenesis* 6:1653-1665.

Wagner, J.G. (1971). *Biopharmaceutics and relevant pharmacokinetics*. Chapt. 4. Drug Intelligence Publications, Hamilton, Ill. pp. 18-25.

Wartenberg, D. et Gallo, M.A. (1990). «The fallacy of ranking possible carcinogenic hazards using the TD_{50}». *Risk Anal.* 10:609-613.

Wattenberg, L.W. (1978). «Inhibition of chemical carcinogenesis». *J. Natl. Cancer Inst.* 60:11-18.

Weinstein, I.B. (1985). «The relevance of tumour promotion and multistage carcinogenesis to risk assessment». *Risk quantitation and regulatory policy*. Banbury Report 19, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 231-240.

Whittemore, A. et Keller, J. (1978). «Quantitative theories of carcinogenesis». *SIAM Rev.* 20:1-30.

WHO (1984). Recommended health-based occupational exposure for respiratory irritants. Report of a WHO Study Group. WHO Tech. Rep. Ser. No. 707. World Health Organization, Geneva.

Wigle, D.T. (1977a). «Bladder cancer: Possible new high-risk occupation». *Lancet* ii:83-84.

Wigle, D.T. (1977b). «Breast cancer and fertility trends in Canada». *Am. J. Epidemiol.* 105:428-438.

Wigle, D.T. et Mao, Y. (1980). *Mortality by income level in urban Canada*. Health and Welfare Canada, Ottawa, Ont.

Wigle, D.T., Collishaw, N.E., Kirkbride, J. et Mao, Y. (1987). «Deaths in Canada from lung cancer due to involuntary smoking». *Can. Med. Ass. J.* 136:945-951.

Willis, R.A. (1960). *Pathology of tumours*. 3rd edition. Butterworth, London, U.K.

Yotti, L.P., Chang, C.C. et Trosko, J.E. (1979). «Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by a tumor promoter». *Science* 206:1089-1091.

Zeise, L., Wilson, R. et Crouch, E. (1984). «Use of acute toxicity to estimate carcinogenic risk». *Risk Anal.* 4:187-199.

Zeise, L., Crouch, E.A.C. et Wilson, R. (1986). «A possible relationship between toxicity and carcinogenicity». *J. Am. Coll. Toxicol.* 5:137-151.